



**Mickael da Costa
Santos**

**Utilização de alta pressão para aumentar o teor de
xanto-humol no mosto de cerveja**



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2009

**Mickael da Costa
Santos**

**Utilização de alta pressão para aumentar o teor de
xanto–humol no mosto de cerveja**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Química dos Alimentos, realizada sob a orientação científica do Doutor Jorge Saraiva, Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho à minha família e namorada pelo incansável apoio.

o júri

presidente

Prof^a. Dr. Ivonne Delgadillo Giraldo

professora associada com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Dr. Jorge Manuel Alexandre Saraiva

investigador auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Dr. Fernando Manuel de Jesus Domingues

professor associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Sónia Marília de Almeida e Castro

Investigadora auxiliar da Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica do Porto

agradecimentos

Ao Professor Doutor Jorge Saraiva, orientador deste trabalho, o meu sincero reconhecimento pelos ensinamentos e incentivos que me transmitiu. Agradeço ainda a disponibilidade dispensada ao longo de todo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao iBeSa, Instituto de bebidas e Saúde, pela atribuição de uma bolsa, Nº P11-08, que apoiou a realização deste trabalho.

À UNICER, Bebidas de Portugal, S.A., mais propriamente a todas as pessoas do laboratório Central que me ajudaram nas análises físico-químicas das amostras.

Ao Professor Doutor Fernando Manuel de Jesus Domingues, por toda a ajuda e ensinamentos que me transmitiu sobre a técnica de HPLC.

Ao Paulo Magalhães pela colaboração prestada e conhecimentos transmitidos.

Aos meus colegas de laboratório Cátia, Fátima e especialmente a Isabel Rente, pela ajuda, companheirismo, amizade e pelos muitos e bons momentos que me proporcionaram.

Agradeço, de uma forma especial, os meus amigos Bruno Reis, David, Diogo, Djenisa, Nuno e principalmente ao Ângelo, pela amizade ao longo destes anos todos na Universidade, foram de uma importância enorme para o meu bem-estar e espero que os nossos caminhos nunca se separem.

Por fim, expresso a minha profunda gratidão, aos meus pais, irmão e namorada, por toda força, apoio, confiança e amor que me deram ao longo desta etapa da minha vida.

palavras-chave

Xanto-humul, isoxanto-humul, alta pressão, mosto, cerveja, extracção, lúpulo, cinética de isomerização.

resumo

Este trabalho teve como objectivo principal aumentar o teor de xanto-humul (XN) no mosto de cerveja utilizando alta pressão após a ebulição do mosto, extraindo este composto do lúpulo. Foi primeiramente quantificado o teor de XN e isoxanto-humul (IXN) presente nos *pellets* tipo 45 usados (variedade *Czech Saaz*), tendo-se obtido um teor de XN de $0,370 \pm 0,002\%$ m/m e um valor de IXN abaixo do limite de detecção.

Após a ebulição de mosto “lager” e mosto “preto”, estes foram pressurizados a 25°C de 100 a 500 MPa durante 5 a 15 minutos, com adições de diferentes quantidades de *pellets*. Verificou-se que as amostras de mosto pressurizadas apresentaram um teor de XN mais elevado que as amostras que não sofreram pressurização (em alguns casos chegou-se a atingir concentrações 5 vezes superiores relativamente às amostras não pressurizadas). Estes resultados indicam que ocorreu extracção de XN por alta pressão com muita pouco isomerização do mesmo. As combinações de pressões mais baixas com tempos de pressurização curtos demonstraram ser mais eficientes no que se refere ao aumento de XN no mosto. As amostras de mosto “preto” apresentaram um teor de XN mais elevado que as amostras de mosto “lager”. Foram avaliados parâmetros físico-químicos de algumas das amostras de mosto estudadas e verificou-se que os tratamentos de alta pressão utilizados neste trabalho não alteram o pH, cor e extracto primitivo do mosto, nem causam a isomerização dos ácidos-alfa em ácidos iso-alfa.

Foi também estudada a cinética de isomerização térmica do XN a IXN a 100°C, 90°C e 80°C. Verificou-se que a isomerização térmica diminui com o decréscimo da temperatura, seguindo uma cinética de 1ª ordem. Foram calculadas as constantes cinéticas (k), o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) e o tempo de redução decimal (D) para cada temperatura. Foi obtido para o processo de isomerização de XN a IXN uma energia de activação de $7,94 \times 10^4 \text{ J.mol}^{-1}$ e uma sensibilidade à temperatura (z) de 32°C.

keywords

Xanthohumol, isoxanthohumol, high pressure, wort, beer, extraction, hops, isomerization kinetics.

abstract

This work had as main objective the increase of xanthohumol (XN) content in the wort of beer using high pressure after wort boiling, by extraction of this compound from hops. Firstly, it was quantified the content of XN and isoxanthohumol (IXN) present in the *pellets* type 45 used (Czech Saaz variety), having been found a value of $0,370 \pm 0,002\%$ (w/w) for XN level and value below the detection limit for IXN.

After boiling, "lager" and "black" worts were pressurized at 25°C from 100 to 500 MPa for 5 to 15 minutes, with additions of different amounts of *pellets*. It was verified that the pressurized wort samples presented higher amounts of XN comparatively to the samples that were not submitted to pressure (in some cases around a 5-fold increase in the content of XN was obtained). These results indicate that extraction of XN occurred by high pressure, with very little isomerization. Combinations of lower pressures with short pressurization periods proved to be more efficient to increase the amount of XN in the wort. "Black" wort samples present a higher amount of XN than "lager" wort samples. It was also evaluated some physical and chemicals parameters of some of the wort samples studied, and it was found that the high pressure treatments used in this study do not change the pH, colour and original gravity of the wort, or cause the isomerization of alpha-acids to iso-alpha-acids.

A study was also carried out on the kinetics of thermal isomerization of XN to IXN at 100°C, 90°C e 80°C. It was found that the thermal isomerization followed a first-order kinetics and it decreased with the decreasing of temperature. The kinetics constants (k), the half-life time ($t_{1/2}$) and the decimal reduction time (D) were calculated for each temperature. The activation energy (Ea) for the isomerization process was calculated as being $7,94 \times 10^4 \text{ J.mol}^{-1}$, while a value of 32°C was found for the temperature sensitivity (z) for the isomerization of XN to IXN.

Índice

Índice de figuras	IV
Índice de gráficos	V
Índice de tabelas	VII
Tabela de abreviaturas.....	IX
Parte I. Revisão Bibliográfica	1
1. Cerveja.....	1
1.1 Introdução	1
1.2 Matérias-primas utilizadas na produção de cerveja	2
1.2.1 Malte	2
1.2.2 Cereais não maltados	3
1.2.3 Água.....	3
1.2.4 Lúpulo.....	4
1.2.5 Levedura.....	5
1.3 Processo de produção de cerveja	5
1.3.1 Maltagem	6
1.3.2 Fabrico e tratamento do mosto	6
1.3.3 Fermentação e operações de acabamento.....	8
1.4 Benefícios da cerveja na saúde	9
1.4.1 Vitaminas do grupo B	9
1.4.2 Fibras e minerais	10
1.4.3 Ácidos iso-alfa	10
1.4.4 Compostos fenólicos	11
2. Xanto-humol.....	13
2.1 Introdução	13
2.2 Benefícios do Xanto-humol na saúde.....	13
2.2.1 Actividade antioxidante e combate à obesidade e arteriosclerose	14
2.2.2 Anti-cancerígeno	15
2.2.3 Anti-bacteriano	15
2.2.4 Anti-fúngico	16

2.2.5 Anti-viral	16
2.2.6 Anti-malárico	17
2.3 Xanto-humol no processo cervejeiro	17
2.3.1 Produção de cervejas enriquecidas em xanto-humol	18
3. Tecnologia de alta pressão	20
3.1 Introdução	20
3.2 Efeitos do processamento por alta pressão	22
3.2.1 Inactivação de microorganismos	22
3.2.2 Efeitos nas reacções químicas, bioquímicas e enzimáticas	23
3.2.3 Efeito em processos de extracção	24
3.3 Utilização de alta pressão no processo cervejeiro	24
4. Objectivos do trabalho	25
Parte II. Método Experimental	27
1. Material utilizado e reagentes	27
2. Metodologia aplicada	29
2.1 Preparação das amostras de mosto	29
2.2 Análise quantitativa de XN e IXN por HPLC/UV	31
2.3 Quantificação do XN e IXN nos <i>Pellets</i> tipo 45	32
2.4 Análise do teor de XN e IXN presente nas amostras de mosto	32
2.5 Estudo da cinética de isomerização térmica do XN a IXN num sistema modelo	33
2.6 Análises físico-químicas do mosto	35
Parte III. Resultados e discussão	37
1. Utilização de alta pressão após a ebulição do mosto para extracção do XN	37
1.1 Rectas de calibração do XN e IXN	37
1.2 Quantificação do teor de XN e IXN nos <i>Pellets</i> tipo 45	40
1.3 Pressurização do mosto	43
1.3.1 Efeito de diferentes tempos de pressurização na extracção de XN	43
1.3.2 Efeito de diferentes pressões na extracção de XN	48
1.3.3 Pressurização de mosto “lager” com uma adição de <i>pellets</i> três vezes mais elevada	51
1.3.4 Pressurização de mosto “preto”	55
1.4 Resultados físico-químicos de amostras de mosto	58
2. Estudo da cinética de isomerização térmica do XN	62
2.1 Isomerização térmica do XN a 100°C	62

2.2 Isomerização do XN a 90°C	63
2.3 Isomerização do XN a 80°C	65
2.4 Constantes cinéticas de isomerização do XN a 100 °C, 90 °C e 80 °C	66
2.5 Energia de activação e sensibilidade à temperatura da isomerização do XN	69
Parte IV. Conclusão	71
Referências bibliográficas	73
Anexos	Erro! Marcador não definido.
1. Cromatogramas obtidos por HPLC/UV	Erro! Marcador não definido.
1.1 Cromatogramas obtidos na análise de soluções padrões	Erro! Marcador não definido.
1.2 Cromatogramas obtido na análise de extracto de <i>pellets</i>	Erro! Marcador não definido.
1.3 Cromatogramas obtido na análise de amostras de mosto ...	Erro! Marcador não definido.
1.4 Cromatogramas obtido na análise de amostras do estudo da isomerização térmica do XN	Erro! Marcador não definido.

Índice de figuras

Figura 1- As três formas mais usais do lúpulo utilizados na indústria cervejeira: A- <i>pellets</i> ; B- extracto de CO ₂ supercrítico; C- extracto etanólico	4
Figura 2- Esquema de um processo genérico de produção de cerveja, adaptado de Wunderlich S. <i>et al.</i> [44]	6
Figura 3- Isomerização dos ácidos alfa a ácidos iso-alfa durante a ebulição do mosto, adaptado de Biendl and Pinzl [1].....	10
Figura 4- Glândulas lupulina numa flor feminina não polinizada do lúpulo (<i>Humulus lupulus L.</i>), adaptado de stevens <i>et al.</i> [16]	13
Figura 5- Isomerização térmica do xanto-humol a isoxanto-humol durante a ebulição do mosto, adaptado de Magalhães <i>et al.</i> [9].....	18
Figura 6- Representação esquemática do princípio isostático do processamento por alta pressão, adaptado de Rahman <i>et al.</i> [49].....	21
Figura 7- Esquema da metodologia aplicada para a preparação das amostras de mosto	29
Figura 8- Imagem fotográfica de uma ebulição de mosto “lager” no balão de fundo redondo de três entradas.....	29
Figura 9- Imagem fotográfica do aparelho de alta pressão utilizado no trabalho experimental.....	30
Figura 10 – Imagem fotográfica do Alcolyzer Plus Beer utilizado no trabalho experimental	35
Figura 11- Imagem fotográfica de amostras de mosto “lager” depois (A) e antes de ser pressurizado (B).....	46
Figura 12- Cromatograma referente a uma solução padrão de XN (6mg/L).....	Erro! Marcador não definido.
Figura 13- Cromatograma referente a uma solução padrão de IXN (2mg/L)	Erro! Marcador não definido.
Figura 14- Cromatograma referente a uma amostra de extracto de <i>Pellets 45</i> , variedade <i>Czech Saaz</i>	Erro! Marcador não definido.
Figura 15- Cromatograma referente a análise de XN de uma réplica da amostra-P 400MPa/3x5min	Erro! Marcador não definido.
Figura 16- Cromatograma referente a análise de IXN de uma réplica da amostra controlo-E2 .	Erro! Marcador não definido.
Figura 17- Cromatograma referente a análise de XN de uma réplica da amostra de solução modelo a 100°C retirada ao fim de 0 minutos	Erro! Marcador não definido.

Figura 18- Cromatograma referente a análise de IXN de uma réplica da amostra de solução modelo a 100°C retirada ao fim de 30 minutos **Erro! Marcador não definido.**

Índice de gráficos

Gráfico 1- Recta de calibração obtida para o XN (em todos os gráficos os pontos referem-se ao valor médio experimental obtido e as barras de erro representam o respectivo desvio padrão)	38
Gráfico 2- Curva de calibração obtida para o IXN.....	39
Gráfico 3- Representação do teor de XN (mg/L) presente nas amostras de mosto pressurizadas a 250 e 400MPa durante 5, 15 e três vezes 5 minutos e controlos.....	45
Gráfico 4- Representação do teor de IXN (mg/L) presente nas amostras de mosto pressurizadas a 250 e 400MPa durante 5, 15 e três vezes 5 minutos e controlos.....	45
Gráfico 5- Representação do teor de XN+ IXN (mg/L) presente nas amostras de mosto pressurizadas a 250 e 400 MPa durante 5, 15 e três vezes 5 minutos e controlos.	46
Gráfico 6- Representação do teor de XN (mg/L) presente nas amostras de mosto pressurizadas a 100, 200, 250, 300, 400 e 500MPa durante 5 minutos e controlos	49
Gráfico 7- Representação do teor de IXN (mg/L) presente nas amostras de mosto pressurizadas a 100, 200, 250, 300, 400 e 500 MPa durante 5 minutos e controlos	49
Gráfico 8- Representação do teor de XN+IXN (mg/L) presente nas amostras de mosto pressurizadas a 100, 200, 250, 300, 400 e 500 MPa durante 5 minutos e controlos	50
Gráfico 9- Representação do teor de XN (mg/L) presente nas amostras de “3x pellets” pressurizadas e controlos.....	52
Gráfico 10- Representação do teor de IXN (mg/L) presente nas amostras “3x pellets” pressurizadas e controlos	53
Gráfico 11- Representação do teor de XN+IXN (mg/L) presente nas amostras “3x pellets” pressurizadas e controlos.....	53
Gráfico 12- Representação do teor de XN (mg/L) presente nas amostras de mosto “preto” pressurizadas e controlos.....	56
Gráfico 13- Representação do teor de IXN (mg/L) presente nas amostras de mosto “preto” pressurizadas e controlos.....	56
Gráfico 14 - Representação do teor de XN+IXN (mg/L) presente nas amostras de mosto “preto” pressurizadas e controlos.....	57

Gráfico 15- Representação dos valores do teor de X_N , IX_N e X_N+IX_N nas amostras de solução modelo a 100°C em função do tempo.....	63
Gráfico 16- Representação dos valores do teor de X_N , IX_N e X_N+IX_N nas amostras de solução modelo a 90 °C em função do tempo.....	64
Gráfico 17 - Representação dos valores do teor de X_N , IX_N e X_N+IX_N nas amostras de solução modelo a 80 °C em função do tempo.....	66
Gráfico 18 - Representação dos valores de $\ln(x/x_0)$ em função do tempo para 100 °C, 90 °C, 80°C	67
Gráfico 19- Representação dos valores de $\ln(k)$ em função de $1/T$ (A) e representação dos valores de $\log(D)$ em função da temperatura (B).....	69

Índice de tabelas

Tabela 1- Valores máximos de alguns dos polifenóis mais importantes presentes no lúpulo, adaptado de Biendl and Pinzl [1].	11
Tabela 2- Valores máximos e estruturas dos prenilflavonóides frequentemente presentes na cerveja.	12
Tabela 3- Principais aspectos da tecnologia “XAN” no processo cervejeiro, adaptado de Back <i>et al.</i> [48] e Wunderlich <i>et al.</i> [44]	19
Tabela 4- Características da coluna Nucleosil C ₁₈ utilizada para HPLC/UV	28
Tabela 5- Características dos <i>Pellets</i> utilizados no trabalho experimental	28
Tabela 6 - Dosagem dos <i>pellets</i> nos diferentes ensaios realizados	31
Tabela 7 – Valores de área do pico e tempo de retenção obtidos por análise de soluções padrão de XN por HPLC/UV	37
Tabela 8- Valores de área de pico e tempo de retenção obtidos por análise de soluções padrão de IXN por HPLC/UV	39
Tabela 9- Equações das rectas de calibração do XN e IXN, correlação linear e limites de detecção correspondentes	40
Tabela 10- Valores de IXN obtidos da análise por HPLC/UV dos extractos de <i>pellets</i>	41
Tabela 11- Valores de XN obtidos da análise por HPLC/UV dos extractos de <i>pellets</i>	41
Tabela 12- Valores das áreas de pico obtidos para a quantificação do factor de recuperação do XN	42
Tabela 13- Dosagem dos <i>pellets</i> nos ensaios realizados para optimização da gama tempo/pressão, bem como as respectivas concentrações de ácidos alfa e XN	44
Tabela 14- Valores do teor de XN, IXN e XN+IXN presentes nas amostras de mosto controlo pressurizadas a 250 e 400 MPa durante 5, 15 e 3 vezes 5 minutos, bem como os correspondentes desvios padrões e coeficientes de variação.	44
Tabela 15- Valores do teor de XN, IXN e XN+IXN presentes nas amostras de mosto controlo e pressurizadas a 100, 200, 250, 300, 400 e 500 MPa durante 5 minutos, bem como os correspondentes desvios padrões e coeficientes de variação.	48
Tabela 16- Dosagem dos <i>pellets</i> nos ensaios “3x <i>pellets</i> ” realizados, bem como as respectivas concentrações de ácidos alfa e XN	51

Tabela 17- Valores do teor de XN, IXN e a soma deles presentes nas amostras “3x <i>pellets</i> ” controlo e pressurizadas, bem como os correspondentes desvios padrões e coeficientes de variação	52
Tabela 18- Valores do teor de XN, IXN e XN+IXN presentes nas amostras de mosto “preto” controlo e pressurizadas, bem como os correspondentes desvios padrões e coeficientes de variação	55
Tabela 19- Valores de pH, cor, amargor e extracto das amostras de mosto “lager” analisadas.....	59
Tabela 20- Valores de pH, cor, amargor e extracto das amostras de mosto “preto” analisadas.....	59
Tabela 21- Valores de pH, cor, amargor e extracto das amostras <i>inicial</i> , <i>press</i> e <i>contact</i> analisadas	61
Tabela 22- Valores do teor de XN, IXN e XN+IXN presentes ao longo do tempo na solução modelo a 100 °C, bem como os correspondentes desvios padrões e coeficientes de variação.....	62
Tabela 23- Valores do teor de XN, IXN e XN+IXN presentes ao longo do tempo na solução modelo a 90 °C, bem como os correspondentes desvios padrões e coeficientes de variação.....	64
Tabela 24- Valores do teor de XN, IXN e XN+IXN presentes ao longo do tempo na solução modelo a 80 °C, bem como os correspondentes desvios padrões e coeficientes de variação.....	65
Tabela 25- Valores de $\ln(x/x_0)$ e respectivo tempo para 100 °C, 90 °C e 80 °C	67
Tabela 26- valores das constantes cinéticas (com os respectivos intervalo de variação com 95% de confiança), tempo de redução decimal e tempo de meia vida para 100 °C, 90 °C e 80 °C.....	68
Tabela 27- Valores de $1/T$, $\ln(k)$ e $\log(D)$ para 100 °C, 90 °C e 80 °C.....	69

Tabela de abreviaturas

Abreviatura	Designação
6-PN	6-prenilnaringenina
8-PN	8-prenilnaringenina
A	Factor pré-exponencial de Arrhenius
Amostras-P	Amostras pressurizadas
AP	Alta pressão
BVDV	Diarreia viral bovina
CMI	Concentração mínima inibitória
CO₂	Dioxido de carbono
D	Tempo de redução decimal (minuto)
DGAT	Diacilglicerol aciltransferase
DMX	Desmetilxanto-humol
D_{ref}	Tempo de redução decimal a uma temperatura referência (minuto)
Ea	Energia de activação
EC₅₀	Concentração para obter 50% de resposta
HPLC/UV	Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção espectrofotométrica
HSV-1	Vírus de herpes tipo 1
HSV-2	Vírus de herpes tipo 2
IC₅₀	Concentração na qual se consegue inibir 50%
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
IXN	Isoxanto-humol

k	Constante cinética (min^{-1})
L.D.	Limite de detecção
L.Q.	Limite de quantificação
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
min	Minuto
n	Número de réplicas
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
R	Constante dos gases perfeitos ($\text{J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$)
R²	Coefficiente de correlação linear
t	Tempo (minuto)
T	Temperatura (K ou °C)
t_{1/2}	Tempo de meia vida (minuto)
TG	Triacilgliceróis
T_{ref}	Temperatura referência (K)
UA	Unidade de amargor
UV	Espectroscopia de ultravioleta
VIS	Espectroscopia do visível
x	Concentração de XN (mg/L)
x₀	Concentração inicial de XN (mg/L)
XN	Xanto-humol
z	Indicador da sensibilidade à temperatura(°C)

Parte I. Revisão Bibliográfica

1. Cerveja

1.1 Introdução

As primeiras referências à cerveja datam de 8.000 a.C, sendo que os egípcios, babilónios, assírios e sumérios já fabricavam e degustavam a sua cerveja há 6.000 anos [1]. Porém no século XIX o fabrico da cerveja recebeu um maior impulso através da resolução de dois problemas fundamentais, o isolamento das leveduras responsáveis pela fermentação, o que ficou a dever-se a Pasteur, e a possibilidade de manutenção dos tanques de fermentação e das caves de armazenamento a temperaturas convenientemente baixas, durante todo o ano [2]. Hoje em dia a cerveja é das bebidas mais consumidas e apreciadas em todo o mundo, sendo uma bebida cada vez mais popular, devido a variados efeitos positivos para a saúde decorrentes da sua ingestão [3].

De acordo com a legislação portuguesa, “a cerveja é uma bebida obtida por fermentação alcoólica, mediante leveduras seleccionadas do género *Saccharomyces*, de um mosto preparado a partir de malte de cereais, principalmente cevada e outras matérias-primas amiláceas ou açucaradas, ao qual foram adicionadas flores de lúpulo ou seus derivados e água potável” [4].

São várias as classificações que se podem escolher para diferenciar os diferentes tipos de cervejas, sendo que, se podem classificar pelo teor alcoólico (sem álcool, de baixo, médio ou alto teor alcoólico), a cor (clara ou escura), o teor do extracto primitivo (fracas, normais, extras e fortes) e principalmente o tipo de fermentação. Relativamente ao tipo de fermentação pode agrupar-se a cerveja em três grupos que abrangem praticamente todos os tipos de cervejas comercializadas, Lager, Ale e Lambic [5].

Cerveja de fermentação baixa (Lager) - As Lager são o tipo de cerveja mais comum, quer em Portugal, quer no resto do mundo. O mosto é mantido a uma temperatura entre 5 e 10 °C. A fase principal da fermentação dura cerca de 7 dias. No início da fermentação há formação abundante de espuma (fermentação tumultuosa), sendo que a levedura utilizada sedimenta e deposita-se no fundo da cuba de fermentação. Apresentam um teor alcoólico que varia entre 4 e 5 % (em vol), sendo douradas, transparentes, leves e com boa espuma. Como exemplos de cervejas deste tipo referem-se as *lagers*, *pilseners*, *munichs*, *vienna*, *bock*, *dortmunder* e *einbeck*, entre outras [5].

Cerveja de fermentação alta (Ale) – Neste caso, a fermentação é realizada a temperaturas mais altas e em tempos mais curtos que as Lager (entre 15 e 25 °C durante 3 a 4 dias). As leveduras não

Parte I. Revisão Bibliográfica

se depositam nas cubas, mas sobem à superfície da cerveja. O seu teor alcoólico é variável, podendo ir de 3 a 10 %. São cervejas mais densas e encorpadas, de cor mais carregada e de paladar acentuado, devido ao processo de fermentação realçar os aromas e sabores mais frutados e lupulados da cerveja. Como exemplos de cervejas deste tipo referem-se as *ale*, *bess*, *stout*, *porter*, *hefe* e *weiss*, entre outras. [5]

Cerveja de fermentação espontânea (Lambic) – a fermentação realiza-se espontaneamente durante 1 a 2 anos à temperatura ambiente, sendo o mosto contaminado por leveduras presentes na atmosfera. Apresentam aromas complexos e uma elevada acidez, podendo ser preparadas a partir da maceração de diversos frutos, tais como pêssego ou cerejas, conferindo-lhes paladares muito diversificados. O seu teor alcoólico varia entre 5 e 6 %. Este tipo de cerveja é tradicionalmente elaborado na Bélgica. Como exemplos de cervejas deste tipo referem-se as *lambics*, *krieks* ou *gueuzes*. [5]

De seguida descrevem-se, de modo mais pormenorizado, as matérias-primas e o modo de fabricação de uma cerveja.

1.2 Matérias-primas utilizadas na produção de cerveja

Os principais ingredientes utilizados no fabrico da cerveja são o malte de cevada, a água, o lúpulo, levedura e, em determinados tipos de cervejas, cereais não maltados. Estes ingredientes entram em fases distintas no processo de produção da cerveja. [5-7]

1.2.1 Malte

Os grãos de cevada são sujeitos a um processo de germinação sob condições controladas e pré-determinadas, denominada maltagem, originando assim o malte. O malte da cevada é uma das matérias-primas fundamentais, sendo a cevada o cereal mais utilizado na produção de cerveja pelo facto de: [5-7]

- ✓ Ser rico em amido e em enzimas (α -amilase e β -amilase) capazes de o transformar em açúcares;
- ✓ Possuir um alto teor de proteínas em quantidade suficiente para fornecer os aminoácidos necessários para o crescimento da levedura;
- ✓ Possuir substâncias azotadas, que têm um papel importante na formação da espuma;
- ✓ A sua casca servir como meio de filtração do mosto;

A escolha inadequada desta matéria-prima poderá ter como consequências a obtenção de um mosto turvo, dificuldades na clarificação e sacarificação, queda de rendimento nos ciclos de filtração e problemas com o sabor e a espuma da cerveja. [5-7]

1.2.2 Cereais não maltados

Os cereais não maltados são fonte de extracto usado na produção de cerveja, sendo normalmente utilizados o arroz, o trigo e, frequentemente, o milho. A utilização destes cereais tem como objectivo a diminuição da percentagem de proteínas existentes no mosto e obtenção de cervejas mais leves, com menos cor e com características específicas, consoante o cereal escolhido. A utilização de cereais não maltados tem também sido utilizado na indústria cervejeira para reduzir custos de produção. [5-7]

1.2.3 Água

A água é um elemento essencial no processo de produção de cerveja, pois a cerveja é constituída por 90 a 95% de água. Assim sendo, as suas características físicas e químicas serão fundamentais para se obter uma cerveja de boa qualidade. A água utilizada para produção de cerveja tem de ser obrigatoriamente potável, podendo sofrer correcções químicas de acordo com a sua composição, sendo necessário, antes da sua utilização, algumas análises químicas, como: cor, turbidez, dureza, pH, entre outras. O controlo do pH da água é fundamental, pois um pH alcalino poderá ocasionar a dissolução de materiais existentes no malte e nas cascas, que são indesejáveis no processamento. O pH ideal da água para a produção de cerveja está entre 6,5 e 7,0. [5-7]

Certos tipos de cerveja só são possíveis com o tipo de água adequado, sendo que, constituintes tais como magnésio, sódio, cloretos e sulfatos influenciam directamente o gosto da cerveja. Por exemplo, uma cerveja de fermentação baixa requer o uso de água com pouca mineralização e baixa alcalinidade (água mole), por outro lado, uma cerveja de fermentação alta tira partido de águas com alguma alcalinidade e elevado teor de bicarbonatos (água dura).

A água é um dos factores decisivos na escolha do local para a instalação de uma cervejaria, visto que a indústria cervejeira consome grandes quantidades de água (por cada litro de cerveja produzida são necessários 5 a 7 litros de água), sendo necessário que a fábrica esteja instalada próxima a uma fonte abundante de água de boa qualidade. [5-7]

1.2.4 Lúpulo

Geralmente designado como o “tempero” da cerveja, por conferir amargor e aroma à cerveja, o lúpulo contribui também para a estabilidade microbiológica e físico-química e para a formação de uma boa espuma na cerveja [1, 5, 6].

O lúpulo é obtido a partir de uma planta denominada *Humulus lupulus* L., da família *Cannabaceae*. As flores de lúpulo contêm pequenas glândulas (um fino pó amarelo), denominadas glândulas de lupulina, ricas em resinas de amargor (principalmente humulonas ou ácidos alfa) e óleos essenciais. Somente as flores femininas não polinizadas do lúpulo podem ser utilizadas no fabrico da cerveja, uma vez que as resinas de lúpulo, que dão o amargor e durabilidade à cerveja estão apenas presentes nestas flores [1].

O uso de lúpulo na fabricação de cerveja remonta ao ano de 736, em Hallertau, na Alemanha (principal produtor do lúpulo), apesar de se ter tornado popular somente no século XVI [1].

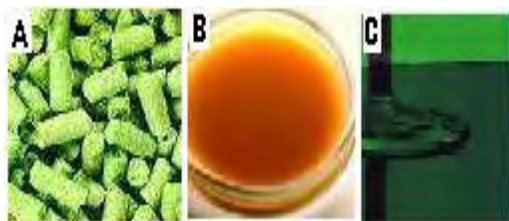


Figura 1- As três formas mais usais do lúpulo utilizados na indústria cervejeira: A- *pellets*; B- extracto de CO₂ supercrítico; C- extracto etanólico

Para ultrapassar os problemas de armazenamento prolongado e de forma a preservar as suas capacidades, o lúpulo pode apresentar-se na forma de *pellets* ou em forma de extracto (Figura1), destacando-se neste os extractos etanólico e de CO₂ supercrítico, obtidos por extracção com etanol ou com CO₂ supercrítico, respectivamente [1, 5-7].

Pellets

O uso de lúpulo em *pellets* é mais recente (1975) do que o uso de extractos, mas é a forma de lúpulo dominante nos dias de hoje. Os *pellets* são folhas de lúpulo moídas e prensadas em forma de pequenos bastões, levando a vantagens não só a nível de armazenamento, uma vez que são menos sensíveis à oxidação mesmo à temperatura ambiente, como também a nível de manuseamento e doseamento.

Existem dois tipos de *pellets* principais utilizados na indústria cervejeira, *pellets* tipo 45 e tipo 90. No processo de fabricação dos *pellets* do tipo 45 é removido algum material vegetativo, fazendo com que apesar de apresentarem uma concentração de ácidos alfa superior aos *pellets* do tipo 90, as concentrações de polifenóis, metais e resíduos sejam inferiores. [1, 8]

Extracto ao CO₂ supercrítico

O dióxido de carbono (CO₂) como fluido supercrítico é actualmente o solvente mais aceite pela indústria cervejeira para o fabrico de extractos de lúpulo [1]. O modo de obtenção destes extractos consiste na introdução de CO₂ supercrítico, proveniente de um compressor, num extractor contendo *pellets*. Os seus extractos contêm quase todos os óleos essenciais do lúpulo, um elevado rácio de ácidos alfa para ácidos beta (lupulonas menos amargas), uma pequena quantidade de resinas duras, menor vestígio de triglicerídeos, ceras, clorofilas e sais inorgânicos e não apresentando vestígios de solventes. Além disso, o extracto ao CO₂ supercrítico apresenta baixa viscosidade e baixo ponto de fusão. [1, 8]

Extracto etanólico

O etanol foi um dos primeiros solventes a ser utilizado para a extracção dos componentes aromáticos e amargos do lúpulo. Para este tipo de extracção utiliza-se etanol a 90%, e em contraste com o CO₂ pode usar-se cones de lúpulo como material inicial (sem ser necessário a peletização). Obtêm-se assim extractos ricos em polifenóis, algo que não acontece com o CO₂ supercrítico como já foi referido. O extracto etanólico foi ao longo do tempo perdendo posição e valor na indústria cervejeira devido ao facto de ser um solvente muito extractivo e pouco selectivo, extraindo quase na totalidade todos os componentes da lupulina, pigmentos da planta, ceras e compostos insolúveis em água. [1, 8]

1.2.5 Levedura

A levedura utilizada na produção de cerveja é do género *Saccharomyces*, sendo responsável pelo processo de fermentação da cerveja, transformando em condições anaeróbias os açúcares do mosto em álcool e dióxido de carbono.

Existem duas espécies de levedura utilizadas na produção de cerveja, a usada na cerveja de fermentação alta – *Saccharomyces cerevisiae*, e a de fermentação baixa – *Saccharomyces uvarum*. O aroma da cerveja depende da estirpe de levedura utilizada, podendo apresentar aromas florais, frutados ou minerais, indicados para diferentes tipos de cerveja. A levedura é, portanto, um elemento essencial para a produção de cerveja, sendo a selecção correcta desta um ponto absolutamente crítico para a qualidade do produto final. [5-7]

1.3 Processo de produção de cerveja

Depois da pesquisa bibliográfica efectuada verificou-se a existência de inúmeras variações no processo de fabrico conforme as matérias-primas utilizadas e o produto final pretendido.

Parte I. Revisão Bibliográfica

Contudo, foi possível identificar a presença de fases comuns a todos eles, sendo essas: a maltagem; fabrico e tratamento do mosto (moagem, brassagem, filtração, ebulição, clarificação e arrefecimento); fermentação e operações de acabamento (maturação, filtração e acondicionamento) [7]. A Figura 2 pretende representar, resumidamente, as principais fases de produção da cerveja que são descritas de seguida. [5-7]

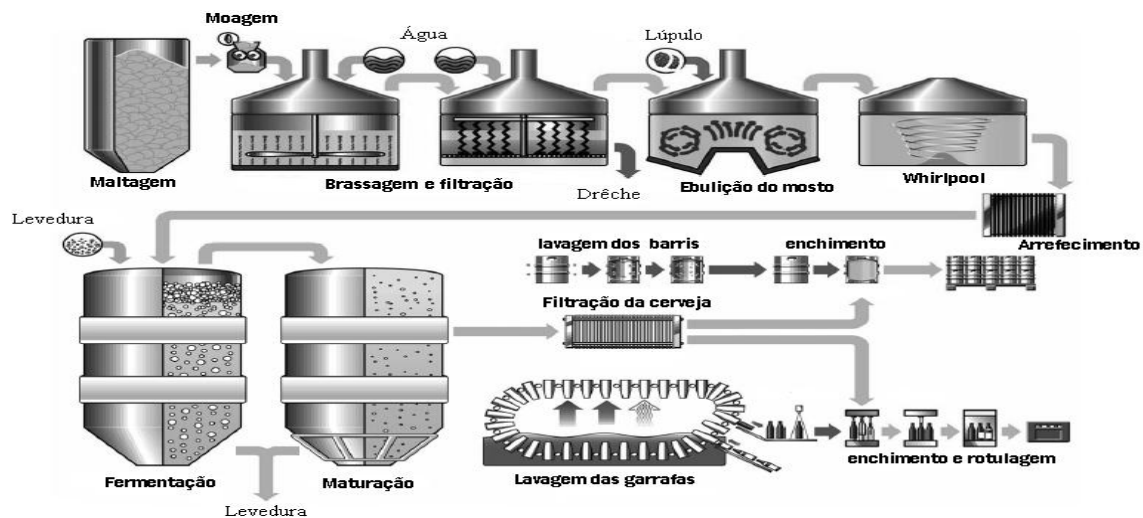


Figura 2- Esquema de um processo genérico de produção de cerveja, adaptado de Wunderlich S. *et al.* [44]

1.3.1 Maltagem

A maltagem é o processo da passagem da cevada a malte, sendo relevantes três operações, a molha, a germinação e a secagem. Primeiro, a cevada é mergulhada em água e exposta ao ar durante cerca de dois dias, tendo como finalidade fornecer ao grão o grau de humidade necessário para a germinação. Durante a germinação são sintetizadas enzimas hidrolíticas, necessários à hidrólise parcial dos componentes da cevada (amido, proteínas e constituintes das paredes celulares), tornando o grão mais quebradiço. A secagem do malte tem como objectivo parar a germinação e deve ser feita com cuidado, com controlo de temperatura para que as enzimas do malte não sejam destruídas. [5-7]

1.3.2 Fabrico e tratamento do mosto

A passagem do malte a mosto começa pela moagem do grão e acaba no arrefecimento do mosto, iniciando-se posteriormente a fase de fermentação. O fabrico do mosto compreende, portanto, diversas etapas que vão ser descritas seguidamente. [5-7]

Moagem

O malte é cuidadosamente triturado num moinho, de tal forma que as cascas são mantidas praticamente intactas, ajudando depois na filtragem, enquanto o resto se transforma numa farinha grosseira. A moagem possibilita a libertação do amido presente no endosperma, para que todas as enzimas activas acumuladas na maltagem entrem em contacto com este na brassagem. [5-7]

Brassagem e filtração

A brassagem envolve mistura de malte moído e sólido com água a uma temperatura adequada para continuar as alterações bioquímicas iniciadas durante o processo de maltagem. O processo é realizado em condições controladas de tempo, temperatura, pH e agitação, com o objectivo de permitir a actividade das enzimas responsáveis pela acidificação do mosto e conversão de amido e proteínas em moléculas mais simples susceptíveis de serem utilizadas na fase de fermentação. As principais enzimas responsáveis pela conversão do amido são as α - e β -amilases, mas também actuam proteases na conversão de proteínas, levando a uma mistura de açúcares, péptidos e aminoácidos.

Depois da brassagem, quando o amido é hidrolisado, o mosto (a parte solúvel) é separado da *dreche* (parte insolúvel) que contém grandes quantidades de proteínas, matérias gordas, silicatos e taninos. Este processo é realizado em filtros prensa ou cubas onde a *dreche* funciona como camada filtrante. [5-7]

Ebulição

O mosto, diluído e filtrado, é levado à ebulição com adição de lúpulo (em forma natural, *pellets*, extracto ou combinação de duas das três formas de lúpulo) durante uma hora e meia a duas horas dependendo do tipo de cerveja a ser fabricado. O objectivo da ebulição é estabilizar o mosto e extrair os componentes desejáveis do lúpulo.

As principais alterações que ocorrem durante a ebulição são a pasteurização do mosto (destruição dos microrganismos vegetativos do malte, lúpulo e cereais); inactivação de amilases residuais e outras enzimas; precipitação de proteínas de peso molecular elevado; o cálcio proveniente da água precipita sobre forma de fosfato de cálcio, induzindo a dissociação do ácido fosfórico com a consequente libertação de protões e queda do pH do mosto; desenvolvimento de cor (caramelização de açúcares via reacções de Maillard, formação de melanoidinas e oxidação de taninos); isomerização dos ácidos alfa a ácidos iso-alfa e do xanto-humul a isoxanto-humul; destilação de matérias voláteis, oxidação e fixação da concentração final do mosto. [5-7]

Parte I. Revisão Bibliográfica

Clarificação e arrefecimento

No final do período de ebulição, o mosto é transferido para um reservatório conhecido por *Whirlpool*, em que pela força centrífuga se faz a separação dos resíduos do lúpulo e das proteínas coaguladas do mosto quente, sendo este processo chamado clarificação. Após a clarificação, o mosto é arrefecido através de um permutador de placas até uma temperatura de cerca de 9 °C (temperatura de fermentação) e arejado em condições estéreis, para satisfazer as necessidades da levedura na fermentação. [5-7]

1.3.3 Fermentação e operações de acabamento

Nesta fase decorre o processo de transformação do mosto em cerveja, ocorrendo a fermentação, a maturação, filtração e por fim o acondicionamento. [5-7]

Fermentação e maturação

A fermentação é uma etapa determinante para a qualidade da cerveja obtida. A fermentação pode ser dividida em fermentação primária e secundária (também conhecida como maturação).

A fermentação é a operação na qual depois de adição da *Saccharomyces*, à temperatura controlada, os açúcares do mosto pela acção da levedura são convertidos em etanol, dióxido de carbono e outros metabolitos. Estes metabolitos, tais como aldeídos, álcoois superiores e ésteres, embora presentes em pequenas quantidades, contribuem decisivamente para o aroma da cerveja. A fermentação é conduzida a temperaturas controladas que podem variar entre 5 e os 26 °C, dependendo da estirpe da levedura e tem uma duração entre 3 a 7 dias.

Terminada a fermentação, a cerveja é enviada para os tanques de maturação onde é mantida a cerca de 0 °C por períodos variáveis. Essa fase é importante pois ocorre a sedimentação de algumas partículas em suspensão e também se desencadeiam algumas reacções que produzem alguns aromatizantes essenciais da cerveja. [5-7]

Filtração e acondicionamento

A cerveja antes de ser acondicionada é filtrada normalmente com auxílio de *Kieselguhr* (terra de diatomáceas devidamente calcinadas e com teor controlado de ferro), que preenche o filtro, para a remoção de partículas, tais como complexos proteína - polifenol e leveduras residuais. A filtração confere à cerveja uma melhor estabilidade microbiológica, coloidal e organoléptica, deixando-a clara e brilhante [5-7].

Um importante processo após a filtração e antes da embalagem é o ajuste de dióxido de carbono, até cerca de 5 g/L. O CO₂ não só contribui para aumento da espuma, mas também desempenha um papel importante no prolongamento do prazo de validade da cerveja.

A etapa final da produção de cerveja é o enchimento, podendo a cerveja ser acondicionada em diferentes embalagens como garrafa, lata ou barril. Antes ou após o enchimento, dependendo da embalagem, é necessário proceder à estabilização microbiológica da cerveja por pasteurização. A cerveja em garrafa/lata é pasteurizada unidade a unidade (pasteurização em túnel) durante 15 minutos a 62 °C. Se a cerveja for acondicionada em barril é previamente pasteurizada em linha durante 30 segundos a 75 °C usando permutador tubular (pasteurização flash), sendo seguidamente acondicionada nos barris [5-7].

1.4 Benefícios da cerveja na saúde

Hoje em dia é aceite que consumo excessivo de cerveja e de outras bebidas alcoólicas podem ser prejudiciais para a saúde humana, provocando disfunções do sistema digestivo e sistema nervoso, cancro, hipertensão e doenças musculares [9]. No entanto, em vários estudos tem sido demonstrado que o consumo moderado de cerveja, associada a um bom padrão geral de nutrição (como o consumo muito variado e abundante de frutas e vegetais) ajuda a prevenir doenças tais como, diabetes tipo-2 [9-11], doenças cardíacas crónicas [9, 11-13], a hipertensão arterial [1, 9], doenças neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson) [9, 14, 15], a osteoporose [9, 11, 16], arteriosclerose [9, 11], e muitos tipos de cancro [9, 17-19]. Sendo assim, a cerveja pelos seus benefícios na saúde e baixo custo, pode vir a ser uma “bebida cardio-protectora” de eleição, competindo com o vinho tinto [20].

Os benefícios da cerveja provêm dos seus componentes com grande valor nutricional que são associados a efeitos positivos sobre o corpo humano, sendo eles, vitaminas (grande parte vitaminas do grupo B), minerais (potássio, magnésio, silício e outros), fibras, substâncias amargas (ácidos iso-alfa) e especialmente compostos fenólicos. Alguns dos componentes desta bebida são obtidos a partir das matérias-primas, anteriormente referidas, e mantêm-se inalteradas após todo o processo de produção da cerveja, outros são produtos resultantes de transformações químicas e bioquímicas das mesmas matérias-primas [1, 9].

De seguida, apresentam-se algumas considerações gerais dos componentes principais da cerveja, com interesse nutricional, organoléptico e nutracêutico.

1.4.1 Vitaminas do grupo B

As vitaminas do grupo B presentes na cerveja como por exemplo a piridoxina (vitamina B₆), riboflavina (B₂), niacina (B₃), tiamina (vitamina B₁) e o ácido fólico (vitamina B₉) dão uma protecção adicional aos seus consumidores contra as doenças cardiovasculares. Além disso, o ácido

Parte I. Revisão Bibliográfica

fólico também têm uma acção protectora contra certos tipos de cancro, sendo uma vitamina de particular importância que não é encontrada em mais nenhuma bebida destilada ou fermentada [21].

1.4.2 Fibras e minerais

A cerveja é ainda uma fonte de fibra solúvel derivada das paredes das células dos grãos de cevada maltada, podendo um litro de cerveja conter, em média, 20% da dose diária recomendada de fibra. As fibras além de ajudarem a uma saudável função intestinal, reduzem os níveis de colesterol, que por sua vez, diminui o risco de doenças do coração [22].

Relativamente aos minerais na cerveja pode-se realçar o elevado teor de potássio e baixo valor de sódio, indispensável a uma tensão sanguínea normalizada, além do baixo teor de cálcio e o alto valor em magnésio que ajudam na protecção contra a formação de pedra nos rins [23].

1.4.3 Ácidos iso-alfa

Os ácidos iso-alfa provêm da isomerização dos ácidos alfa provenientes do lúpulo (Figura 3), na etapa da ebulição do mosto, sendo dos compostos que mais contribuem para o sabor característico da cerveja [1].

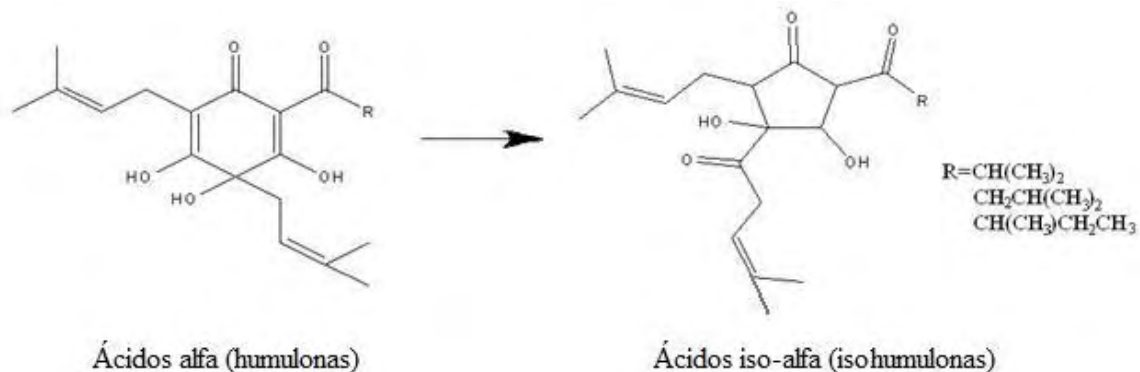


Figura 3- Conversão dos ácidos alfa a ácidos iso-alfa durante a ebulição do mosto, adaptado de Biendl and Pinzl [1]

Investigações conduzidas no Japão em 2004 por Yajima *et al.* [24] concluíram que os ácidos iso-alfa estão entre o grupo de compostos naturais capazes de atenuar o curso de doenças como diabetes, arteriosclerose e obesidade. Para os mesmos autores as isohumulonas presentes na cerveja são agentes terapêuticos para o tratamento da síndrome metabólica associada com a resistência à insulina (factores de risco de desenvolver doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2) [24]. Em 2005, também no Japão, estudos científicos de Nozawa *et al.* [25] demonstraram que a cerveja previne o desenvolvimento do cancro do cólon em ratinhos. As cervejas mais lupuladas provaram

ser mais activas do que cervejas menos lupuladas, sendo os ácidos iso-alfa identificados como os constituintes activos [25].

1.4.4 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos, genericamente designados por polifenóis, são originários do metabolismo secundário das plantas e caracterizam -se por conterem na sua estrutura vários anéis benzénicos com grupos hidroxílos [26]. No que diz respeito à indústria cervejeira, os polifenóis do lúpulo (Tabela 1) e malte são compostos de interesse relevante, já que além de contribuírem para o sabor, aroma e estabilidade coloidal da cerveja são responsáveis por diversas propriedades funcionais. Porém, reacções de polimerização dos compostos fenólicos e sua associação com algumas proteínas podem originar turvação [27]. Devido às suas características e propriedades antioxidantes, os polifenóis desempenham um papel importante na nutrição e saúde humana, sendo que, nos últimos anos têm sido realizados vários estudos sobre antioxidantes, especialmente a partir de polifenóis da cerveja e das suas matérias-primas [9].

Tabela 1- Valores máximos de alguns dos polifenóis mais importantes presentes no lúpulo, adaptado de Biendl and Pinzl [1].

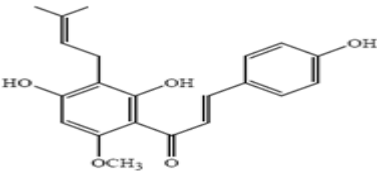
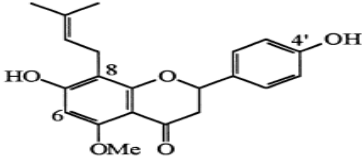
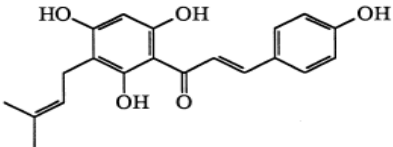
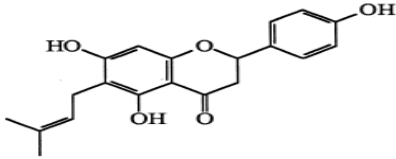
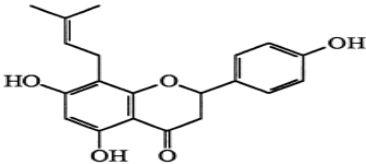
Polifenóis	% máxima encontrada no lúpulo
Catequina	0,2
Quercetina	0,2
Campferol	0,1
Ácido ferúlico	0,01
Resveratrol	0,01
Prenilflavonóides	1,3

Os flavonóides, uma das classes mais importantes dos polifenóis, possuem um efeito protector sobre o sistema cardiovascular, além de manifestarem propriedades anti-virais e anti-alérgicas [26]. Diversos estudos têm dado grande importância aos prenilflavonóides (flavonóides prenilados) da cerveja, considerando-os dos compostos com as propriedades funcionais mais importantes presentes nesta bebida [28]. O lúpulo é a única fonte de prenilflavonóides da cerveja, dos quais, em termos de conteúdo, os mais importantes são o xanto-humol (XN), o isoxanto-humol (IXN) e a 6-prenilnaringenina (6-PN), que correspondem a mais de 90% do total, acompanhados de menores quantidades de 8-prenilnaringenina (8-PN) e desmetilxanto-humol (DMX). Durante a ebulição do mosto ocorre a isomerização da maioria do XN em IXN, como já foi referido anteriormente, e geralmente de todo DMX em 6- e 8-PN, sendo que por este motivo, o IXN e as

Parte I. Revisão Bibliográfica

prenilnaringeninas são mais abundantes na cerveja do que o XN e o DMX, que predominam no lúpulo [28]. Na Tabela 2 apresentam-se os cinco prenilflavonóides mais frequentemente presentes na cerveja, sendo que, constituem um conjunto de compostos bioativos, com interesse crescente. O XN, DMX, e IX, por exemplo, já demonstraram capacidade para inibir a proliferação do cancro da mama, do cólon e ovário [29], o 8-PN é conhecido como o fitoestrogénio mais potente já estudado [16] e o 6-PN é a seguir ao XN o prenilflavonóide mais eficaz contra fungos patogénicos [1]. Entre estas substâncias, tem sido dada especial atenção ao XN, tendo sido relatado nos últimos anos várias actividades biológicas notáveis *in vitro* para este composto [9].

Tabela 2- Valores máximos e estruturas dos prenilflavonóides frequentemente presentes na cerveja.

Prenilflavonóides e os valores máximos encontrados na cerveja (mg/L)	Estrutura	Referência
<u>Xanto-humol</u> 1,2		Stevens <i>et al.</i> [28] Magalhães <i>et al.</i> [9]
<u>Isoxanto-humol</u> 3,4		Stevens <i>et al.</i> [28] Biendl and Pinzl, [1]
<u>Desmetilxanto-humol</u> Vestígios		Stevens <i>et al.</i> [28] Biendl and Pinzl, [1]
<u>6- prenilnaringenina</u> 0,56		Stevens <i>et al.</i> [28] Biendl and Pinzl, [1]
<u>8- prenilnaringenina</u> 0,24		Stevens <i>et al.</i> [28] Biendl and Pinzl, [1]

2. Xanto-humol

2.1 Introdução

O XN é o principal preniflavonóide do lúpulo (0,2-1,1%, m/m) [1]. Como anteriormente discutido a planta do lúpulo é amplamente cultivada especialmente pelos seus metabolitos secundários, principalmente os ácidos alfa e os ácidos beta, que são utilizados na indústria cervejeira para conferir amargor e aroma à cerveja [9]. O XN é segregado como parte das resinas do lúpulo (lupulina) por tricomas glandulares encontrados nas superfícies das brácteas (Figura 4),



além de também se poder encontrar nos tricomas na face inferior das jovens folhas [16]. Recentemente o XN também foi encontrado na planta medicinal chinesa *Sophora flavescens* [1, 9].

Nas resinas do lúpulo o XN é acompanhado com pelo menos 13 calconas, sendo que todas elas têm uma concentração entre 10-100 vezes menor do que o XN [16]. O conteúdo de XN depende principalmente do modo de cultivo e do clima durante o crescimento da planta [9]. A variedade de lúpulo “Taurus” da região alemã de “Halertau” é a variedade que apresenta o maior teor de XN, mesmo em anos de colheitas fracas, podendo conter cerca de 1,1% [1].

Figura 4- Glândulas lupulina numa flor feminina não polinizada do lúpulo (*Humulus lupulus* L.), adaptado de Stevens *et al.* [16]

Desde 1997, o conteúdo de XN presentes nas diferentes variedades de lúpulo em todo o mundo são registradas em cada ano, havendo resultados fiáveis

disponíveis sobre a influência da região, a variedade e ano de cultivo da planta no conteúdo de XN. A relação entre os ácidos alfa e o XN provou ser uma característica de todas as variedades de lúpulos, sendo que em anos com baixo teor de ácidos alfa também o XN apresenta teores baixos [1].

2.2 Benefícios do Xanto-humol na saúde

O XN possui uma importante actividade antioxidante e anti-inflamatória [9, 30, 31], tem sido relatado como um forte inibidor da enzima diacilglicerol aciltransferase ajudando na prevenção à obesidade e arteriosclerose [9, 32, 33] e mostrou ser um eficaz quimiopreventivo de largo espectro na proliferação de várias linhas de células cancerígenas [9, 17, 29, 30, 34, 35]. Além disso, este composto revelou possuir um amplo espectro de actividade anti-infecciosa [9, 36-42],

(anti-bacteriano, anti-fúngico, anti-viral e anti-malárico). Nesta secção serão referidos alguns dos mais recentes e importantes estudos sobre os benefícios do XN na saúde.

2.2.1 Actividade antioxidante e combate à obesidade e arteriosclerose

A arteriosclerose é um processo degenerativo do qual resulta o endurecimento e espessamento da parede das artérias, havendo uma progressiva formação de placas fibrosas prejudicando o fluxo de sangue nas artérias, sendo uma das principais causas de morte nos países ocidentais. Espécies reactivas de oxigénio e nitrogénio desempenham um papel importante nas doenças neurodegenerativas, sendo que podem oxidar lipoproteínas de baixa densidade (LDL), o que é frequentemente associado ao início de arteriosclerose [9].

Investigações de Gerhäuser *et al.* [30] em 2002 mostraram que o XN reduz espécies reactivas de oxigénio, incluindo radicais peróxidos e hidróxidos além de inibir radicais superóxido gerados pela xantina oxidase, sem inibir directamente a actividade dessa enzima. Estudos *in vitro*, a concentrações de 5 e 25 μ M, demonstraram que o XN tem mais capacidade antioxidante, inibindo a oxidação de LDL, do que o α -tocoferol e da isoflavona genisteína mas menos do que a quercetina [31].

A diacilglicerol aciltransferase (DGAT) está exclusivamente envolvida na formação de triacilgliceróis (TG). A excessiva acumulação de TG em determinados órgãos e tecidos do corpo causa condições de alto risco como obesidade e hipertrigliceridémia, levando a arteriosclerose, diabetes, distúrbios metabólicos e depressão funcional de alguns órgãos [9]. Num estudo realizado em 1997 por Tabata *et al.* [33] um extracto metanólico de lúpulo mostrou actividade inibitória contra a DGAT de fígado de rato. Neste estudo o XN apresentou inibição preferencial da formação de TG em células Raji intactas, indicando que inibe a actividade da DGAT. Sendo assim, o XN ao inibir a DGAT e a consequente formação de TG, diminui o risco de arteriosclerose [33].

Potenciais agentes terapêuticos, especialmente produtos naturais, que têm capacidade para inibir a adipogénese (diferenciação dos pré-adipócitos) ou aumentar a morte de adipócitos por apoptose podem ser uma ferramenta importante para a prevenção da obesidade [9]. Recentemente, Yang *et al.* [32] estudaram o efeito do XN e do IXN na apoptose e adipogénese dos adipócitos 3T3-L1, sendo que os adipócitos foram tratados com várias concentrações de XN e IXN. Nos adipócitos maduros, tanto os tratados com XN como os tratados com IXN, houve diminuição de viabilidade e aumento de apoptose. Por outro lado, tanto o XN como o IXN diminuíram a adipogénese durante o período de diferenciação, tendo o XN mostrado mais eficácia.

Baseando-se neste e em outros estudos, alguns autores sugerem que os flavonóides prenilados do lúpulo e da cerveja podem inibir a adipogénese e induzir a apoptose de adipócitos, fazendo com que o XN seja um potencial agente anti-obesidade [9, 32].

2.2.2 Anti-cancerígeno

O XN mostrou ser um eficaz quimiopreventivo de largo espectro na proliferação de várias linhas de células cancerígenas (tais como mama, cólon, ovário, e próstata) [9, 30], demonstrando amplo espectro de inibição nas 3 etapas da carcinogénese, início (moléculas reactivas, danos no DNA), promoção (mutação, mudança na estrutura celular) e progressão (crescimento celular descontrolado, tumores, metástases) [30].

Na etapa inicial da carcinogénese, o XN modula potentemente a actividade das enzimas do citocromo P450 envolvidas na activação metabólica de pró-carcinogénios [30, 35], além de na etapa de promoção, demonstrar propriedades anti-inflamatórias pela inibição da produção de óxido nítrico e da actividade da ciclooxigenase-1 e ciclooxigenase-2 [30]. O XN tem também sido relatado como um forte inibidor da angiogénese [9, 34], sendo que, na etapa de progressão da carcinogénese inibe a síntese do DNA e induz a suspensão do ciclo celular na fase de síntese (fase S), a apoptose e a diferenciação celular [29, 30].

Os estudos *in vivo* em que se avalia o potencial quimiopreventivo do XN ainda são muito limitados. As primeiras evidências de um efeito inibitório de cancro *in vivo* foram fornecidas por investigadores em Heidelberg, Alemanha [17]. Estes investigadores trataram com XN ratinhos com cancro da mama durante duas semanas, sendo que, em comparação com ratinhos de controlo o crescimento tumoral diminuiu 83%. A inibição da angiogénese foi apontada como possível causa da eficácia da diminuição do tumor [17].

2.2.3 Anti-bacteriano

Actualmente, tem sido cada vez mais documentada a actividade anti-bacteriana de resinas e calconas de lúpulo [9].

A placa e cárie dentaria são causados principalmente pela bactéria *Streptococcus mutans*, sendo que tem havido esforços para reduzir a ocorrência de placa e cárie dentaria com um agente anti-microbiano que não esteja associado a efeitos secundários indesejáveis e/ou a desenvolvimento de resistência a antibióticos [9]. Em 2003, Bhattacharya *et al.* [36] estudaram a actividade anti-microbiana dos ácidos beta, ácidos iso-alfa e XN contra quatro estirpes de *S. mutans* e uma de *S. salivarius* e de *S. sanguis*, sendo que todos os componentes do lúpulo testados mostraram actividade anti-microbiana contra as seis estirpes. [36]

Parte I. Revisão Bibliográfica

Recentemente, Natarajan *et al.* [37] investigaram a co-acção de compostos anti-bacterianos derivados do lúpulo como humulonas e XN, com vários antibióticos. A co-acção de lupulonas e XN com os antibióticos sulfato de polimixina B, tobramicina e ciprofloxacina mostrou inibir bactérias Gram-positivas e algumas bactérias Gram-negativas, sendo estes efeitos demonstrados em experiências *in vitro* [37].

2.2.4 Anti-fúngico

As investigações sobre actividade anti-fúngica de constituintes do lúpulo são limitadas. Em 1984, Mizobuchi e Sato [38] estudaram vários componentes do lúpulo, incluindo XN, contra cinco fungos patogénicos (*Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum* e *Mucor rouxianus*), sendo que o XN e o 6-PN foram os que mostraram maior actividade. Com uma concentração mínima inibitória (CMI), de 3,13 mg/mL, ambos os compostos inibiram o crescimento do fungo *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum* mais eficientemente do que o controlo positivo griseofulvina (CIM: 6,25 mg/mL), sendo também observado uma fraca inibição de *Mucor rouxianus* com XN (CMI: 50 mg/mL) [38].

2.2.5 Anti-viral

Doenças virais, incluindo doenças respiratórias virais, herpes, e nomeadamente infecções retrovirais, como por exemplo o HIV-1, são uma preocupação crescente no mundo da saúde. É amplamente documentado que a eficácia da maioria dos agentes anti-virais é limitada pela toxicidade intrínseca dos compostos e pelo aparecimento de vírus resistentes a drogas. Como consequência, a descoberta de novos agentes anti-virais ganhou uma importância crescente [9].

Em 2004, Buckwold *et al.* [39] observaram uma moderada actividade anti-viral de um extracto de lúpulo enriquecido em XN (8,4%), contra a diarreia viral bovina (BVDV), vírus de herpes tipo 1 (HSV-1) e tipo 2 (HSV-2) e rinovírus. Foi também verificado que o XN tem um índice terapêutico (proporção dada entre a dose tóxica dividida pela dose terapêutica) semelhante ao extracto de lúpulo enriquecido contra o BVDV, o HSV-1 e HSV - 2, além de mostrar actividade anti-viral contra a citomegalovírus [39].

Em 2004, num estudo realizado por Wang *et al.* [40], verificou-se que XN inibiu o HIV-1 induzindo efeitos citopáticos, bem como a produção do anti-génio viral p24 e da transcriptase reversa em linfócitos C8166, a concentrações não citotóxicas. O XN também inibiu a replicação

do HIV-1 em células mononucleares periféricas de sangue infectado, tendo um EC_{50} (concentração para obter 50% de resposta) de 20,74 mg/mL. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que o XN pode representar um novo agente quimioterapêutico contra infecções de HIV-1 [40].

2.2.6 Anti-malárico

A malária é uma das doenças comuns mais infecciosas e um dos maiores problemas de saúde pública, sendo que, a doença é causada por parasitas protozoários do género *Plasmodium*. O *Plasmodium falciparum* é responsável por uma grande quantidade de mortes, havendo cerca de 280 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo e mais de um milhão de mortes anualmente [9, 41]. Quando no sangue, o parasita da malária *P. falciparum* entra nos eritrócitos humanos e alimenta-se por degradação enzimática da hemoglobina [9, 41]. O anti-malário mais comum é a cloroquina, contudo as calconas, como por exemplo o XN, têm demonstrado ser uma das classes estruturais com actividade anti-plasmodial/anti-malária mais interessantes [9, 41].

Um dos estudos mais interessantes é o de Herath *et al.* [42] que estudaram a actividade anti-malárica de metabólitos de XN contra estirpes do *P. falciparum* D6 (sensível a cloroquina) e W2 (resistente a cloroquina). A actividade plasmodial da lactato desidrogenase foi determinada como um indicador do número de parasitas restantes nos glóbulos vermelhos, depois da incubação das amostras. O XN mostrou actividade contra ambas as estirpes, tendo valores IC_{50} (concentração na qual se consegue inibir 50%) entre 3,3 µg/mL e 4,1 µg/mL contra as estirpes D6, e entre 1,0 µg/mL e 1,8 µg/mL contra as estirpes W2 [42].

2.3 Xanto-humol no processo cervejeiro

Como foi referido anteriormente, é na etapa da ebulição do mosto que o XN é extraído do lúpulo, sendo também grande parte convertida na sua flavanona isomérica, o IXN (Figura 5). Em geral, esta é a principal razão pela qual as cervejas comerciais de todo o mundo são caracterizadas por um muito baixo teor de XN (máximo de 0,15 mg/L em cervejas convencionais) e um elevado teor de IXN (variando de 0,04 a 3,44 mg/L) [28]. O IXN apesar de ter uma melhor solubilidade que o XN, apresenta efeitos biológicos muito menos promissoras que os do XN [9, 30]. No entanto, existem outros factores responsáveis pela baixo teor de XN, como o carácter hidrofóbico do XN e

Parte I. Revisão Bibliográfica

a sua insuficiente extracção no mosto, além de que grandes quantidades de XN são removidos no *Whirlpool* juntamente com os restos de lúpulo [9, 43-45].

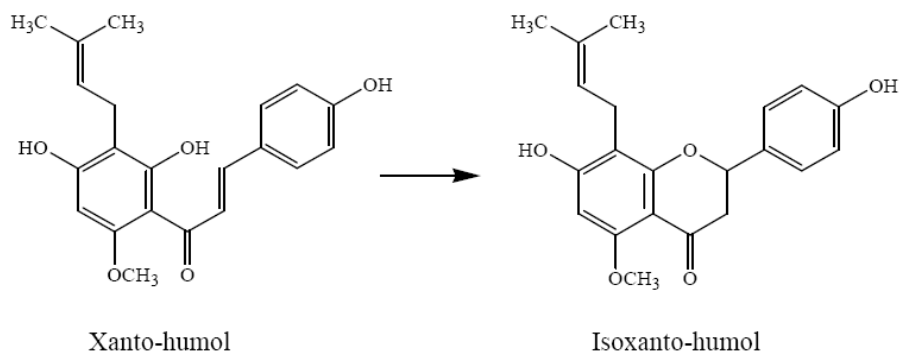


Figura 5- Isomerização térmica do xanto-humol a isoxanto-humol durante a ebulição do mosto, adaptado de Magalhães *et al.* [9]

Durante a fermentação, o conteúdo de XN também diminui, podendo ser devido a adsorção do XN às leveduras na fermentação primária e secundária e/ou por metabolização do XN [9, 43-45], sendo necessário outros estudos com leveduras para se obter mais informações sobre o metabolismo destes. Em relação ao IXN, não parece haver influência das leveduras no teor final deste composto na cerveja, podendo ser devido à diferença de solubilidade, relativamente ao XN, que evita a adsorção às leveduras [9, 44]. Nas cervejas filtradas/estabilizadas com PVPP (polivinilpolipirrolidona) há uma forte redução de teor de XN devido a afinidade deste ao polímero [45], sendo por isso recomendada a estabilização com *Kieselguhr*.

2.3.1 Produção de cervejas enriquecidas em xanto-humol

Os efeitos benéficos para a saúde associados ao XN, referido anteriormente, e o baixo teor deste composto nas cervejas tradicionais têm levado cada vez mais os produtores de cerveja a procurar meios para produzir cervejas enriquecidas em XN [9].

Alguns estudos têm usado extractos enriquecidos em XN para produzir cervejas com alto teor deste composto [44-46], contudo o uso apenas de extractos enriquecidos não mostrou efeitos positivos no teor final de XN na cerveja. Um estudo de Forster *et al.* [47] refere que ao utilizar extractos enriquecidos (30-90%) não se consegue aumentar o teor de XN em cervejas filtradas convencionalmente, recomendando como solução a dosagem do extracto após a filtração, para minimizar as perdas [47]. No entanto, este procedimento é limitado à solubilidade do XN em cervejas Pilsner (3 mg/L), além de não ser conforme a lei alemã da pureza da cerveja, que permite

apenas a adição de extractos de lúpulo em mosto quente [44]. Em 2004, Biendl *et al.* [46] obtiveram apenas resíduos de XN (<0,1 mg/L) e elevado teor de IXN (até 8,6 mg/L) em cervejas brancas produzidas com extractos enriquecidos em XN.

Uma inovação importante para o enriquecimento de cerveja em XN, foi a tecnologia "XAN" desenvolvida por Back *et al.* [48] e por Wunderlich *et al.* [44]. Os principais aspectos desta tecnologia estão esquematizados na Tabela 3, sendo que com esta tecnologia pode ser alcançado 1 a 3 mg/L de XN em cervejas "lager" por filtrar e até 10 mg/L para cervejas pretas já filtradas [44].

Tabela 3- Principais aspectos da tecnologia "XAN" no processo cervejeiro, adaptado de Back *et al.* [48] e Wunderlich *et al.* [44]

Etapas da fabricação da cerveja	Principais aspectos da tecnologia "XAN"
<u>Ebulição</u>	Adição de extracto de lúpulo enriquecido em XN, 5 minutos antes do fim da ebulição e arrefecimento do mosto até 80°C através de adição de água fria
<u>Fermentação</u>	Recuperação da levedura
<u>Estabilização</u>	Não utilização de PVPP
<u>Filtração</u>	Escassa filtração (ou centrifugação)

Em 2004, no Estado da Baviera, a Brewery Weiherstephan introduziu no mercado duas novas cervejas com níveis elevados de XN baseadas na tecnologia "XAN", a "XAN Hefeweissbeer" e a "XAN Wellness". A cerveja "XAN Hefeweissbeer" contém 1,4 mg/L de XN (cerca de 15 vezes mais do que uma "Hefeweissbeer" normal) e teor alcoólico de 5,1% (v/v). Por outro lado a "XAN Wellness" contém cerca de 4 mg /L de XN e um teor alcoólico de 0,05% (v/v), sendo constituída por 40% de cerveja sem álcool e 60% de uma mistura de sumos de limão, maçã e acerola sem quaisquer conservantes [9].

Recentemente, a utilização de malte torrado para produção de cervejas enriquecidas em XN tem sido investigado, obtendo-se resultados bastante positivos [44, 45]. Wunderlich *et al.* [44] investigaram os efeitos do malte torrado no teor de XN na cerveja. Neste estudo verificou-se que as cervejas quando elaboradas com malte bastante torrado, contém maior teor de XN, do que quando elaboradas com malte menos torrado.

Parte I. Revisão Bibliográfica

Em 2008, Magalhães *et al.* [45] investigaram a influência do extracto de lúpulo enriquecido em XN, durante todo o processo cervejeiro, no teor de XN e IXN em cervejas pretas e Pilsner. Verificaram que nos ensaios da cerveja Pilsner o XN foi maioritariamente convertido em IXN durante a ebulição cerveja. No entanto, o uso de malte escuro (malte caramelizado, malte torrado e extracto de malte torrado) revelou um efeito positivo sobre a isomerização térmica do XN, obtendo-se um teor de 3,5 mg/L de XN combinando malte escuro com uma lupulagem tardia de extracto enriquecido. Neste estudo foi também observado que o XN torna a cerveja mais harmoniosa [45]. Estes resultados são indicativos do efeito inibitório do malte torrado na isomerização do XN a IXN durante o processo cervejeiro. Presumivelmente, o XN é adsorvido às substâncias do malte torrado, formando complexos estáveis que se mantêm durante todo o processo, prevenindo a isomerização [44, 45, 48].

Pode-se concluir pelos resultados que ainda existe um “longo caminho a percorrer” para satisfazer as necessidades da maioria dos fabricantes de cerveja no que toca à produção de uma cerveja com alto teor de XN. A solução passa por encontrar produtos enriquecidos em XN mais baratos e estáveis e utilizar tecnologias de processamento inovadoras, como por exemplo a tecnologia de alta pressão.

3. Tecnologia de alta pressão

3.1 Introdução

A tecnologia de alta pressão (AP) tem ganho grande importância em vários campos da biologia, química e física, sendo que inicialmente a tecnologia AP começou a ser aplicada na produção de materiais, tais como cerâmicas, diamantes artificiais e plásticos [49, 50].

Ao nível da indústria alimentar esta tecnologia é relativamente nova, mas já vem aparecendo como uma solução às exigências dos consumidores que pretendem produtos mais seguros, com melhor qualidade em termos de textura, cor, aroma e sabor, minimamente processados, livres de aditivos e estáveis no armazenamento. Estes requisitos sugerem a utilização na indústria alimentar de tratamentos não térmicos como complementares ou alternativos aos tradicionais tratamentos térmicos, pois o aquecimento provoca alterações indesejáveis nos produtos tais como a redução das propriedades nutritivas e organolépticas [51, 52].

O processamento de alimentos por AP é referido como uma tecnologia inovadora. Contudo, tratamentos com AP foram reconhecidos como uma técnica potencial de preservação há cerca de um século, sendo os primeiros estudos sobre o efeito de AP em alimentos e microrganismos

realizados em 1889 por Hite [50]. Apesar deste conhecimento sobre o efeito de AP na inactivação dos microorganismos, o uso da alta pressão na conservação de alimentos só começou a ser utilizado a nível industrial nos últimos 20 anos, primeiro no Japão e mais tarde na Europa [50, 51, 53]. Actualmente alguns alimentos processados por AP já estão a ser comercializados, como: doces, geleias, iogurtes, sumos de frutas, frutas, carne de presunto cru, diferentes produtos fabricados a partir de peixes, entre outros. Alguns sumos de frutas tratados com AP demonstraram ter um melhor sabor, mais vitaminas e prazo de validade mais longo [53].

No processamento por AP, os alimentos líquidos ou sólidos, são acondicionados em embalagens flexíveis e submetidos a pressões entre 100 e 800 MPa, sendo a pressurização realizada num vaso de compressão [50, 51].

A AP pode ser gerada por compressão directa ou indirecta. Na compressão directa, o produto é directamente pressurizado com um pistão, dentro do recipiente de pressurização, enquanto que na compressão indirecta, um amplificador de alta pressão bombeia o fluido através de

um sistema de tubos, para que este chegue ao recipiente [54].

Usualmente o meio transmissor de pressão é água combinada com óleo vegetal ou mineral com objectivo de ser anticorrosivo e anticongelante, sendo que, quando a pressão desejada é atingida, o nível de pressão é mantido ao longo da duração do processo, não requerendo mais energia [55].

A alta pressão baseia-se em dois princípios gerais, o isostático e o de Le Chatelier. O princípio isostático, representado na Figura 6, descreve que a pressão é transmitida através do alimento de forma uniforme e instantânea, sendo independente da sua geometria e tamanho [53]. Esta é uma das principais

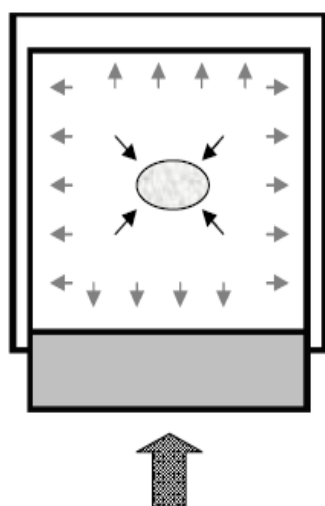


Figura 6- Representação esquemática do princípio isostático do processamento por alta pressão, adaptado de Rahman *et al.* [49]

vantagens do processamento por AP em relação ao tratamento térmico, em que a distribuição da temperatura não é uniforme sendo necessário aumentar o tratamento para que seja atingida a temperatura desejada no interior do alimento, o que provoca a perda de qualidade do produto final [51, 56]. O princípio de Le Chatelier enuncia que todas as reacções químicas, mudanças de conformação molecular, ou transições de fase que sejam acompanhadas por uma diminuição de volume serão favorecidas sob alta pressão, enquanto as reacções que envolvem o aumento de volume serão inibidas [49].

Parte I. Revisão Bibliográfica

O equipamento de AP tem um custo elevado, sendo a principal razão pela qual a sua aplicação é ainda limitada no processamento de alimentos. Todavia, o desenvolvimento tecnológico deste tipo de equipamento tende a tornar os custos do processamento mais competitivos em relação aos métodos de conservação convencionais [51].

3.2 Efeitos do processamento por alta pressão

O processamento de alimentos por alta pressão é principalmente aplicado para promover a inactivação de microrganismos, modificação de biopolímeros (desnaturação de proteínas, activação ou inactivação de enzimas e formação de géis), retenção das propriedades organolépticas (cor, aroma e sabor) e para alterar a funcionalidade de produtos alimentares [53]. Contudo, devido à complexidade dos alimentos e à possibilidade de ocorrerem sob AP alterações e reacções, é difícil prever os efeitos deste tipo de processamento, tal como fazer generalizações acerca de qualquer tipo de alimento [50].

3.2.1 Inactivação de microrganismos

A capacidade do processo de alta pressão de destruir e/ou inactivar microrganismos varia de acordo com o nível de pressão e tempo de tratamento, o produto a ser processado e com o tipo de microrganismo contaminante. Os microrganismos vegetativos são inactivados com tratamentos por alta pressão entre 400 e 600 MPa, sendo que taxa de destruição dos microrganismos aumenta com o aumento da pressão ou do tempo de processamento. No entanto, os microrganismos esporulados têm uma elevada resistência ao tratamento de pressão, podendo resistir até 1000 MPa. Nesse caso, a combinação do tratamento a AP com o tratamento térmico, pode promover uma completa inactivação microbiana [49].

A inactivação microbiana com o aumento da pressão parece estar principalmente relacionada com as alterações na membrana citoplasmática, sendo que a pressão provoca a alteração estrutural da camada de fosfolípidos e algumas desnaturações proteicas modificando a permeabilidade e a selectividade da membrana citoplasmática, podendo resultar a lise celular [57].

Para além dos danos na membrana dos microrganismos, existe uma diminuição do pH devido a compactação das moléculas de água em redor de grupos carregados, com a resultante redução do volume total do sistema, inibindo assim o crescimento dos microrganismos [52].

3.2.2 Efeitos nas reacções químicas, bioquímicas e enzimáticas

A pressão afecta os sistemas de reacção de duas formas: (a) reduz a disponibilidade molecular e (b) provoca o aumento de reacções inter-cadeias [49]. A maior parte das reacções bioquímicas resulta em alteração de volume, e consequentemente, os processos biológicos são influenciados pela aplicação de pressão. As reacções fortemente afectadas pela pressão geralmente incluem reagentes e produtos que diferem quanto ao número de grupos que podem ser ionizados. Quando a diferença de carga entre reagentes e produtos é nula, a reacção é basicamente independente da pressão. A pressão tende a enfraquecer ou quebrar as interacções electrostáticas, de forma a que os iões ficam mais expostos à água. As mudanças de volume são acompanhadas pela formação ou alteração de interacções em biosistemas, como formação de pontes de hidrogénio, efeitos hidrofóbicos, formação de ligações covalentes, volume de activação de reacções químicas, reacções Diels-Alder e Menschutkin e reacções solvolíticas [50, 53].

A AP pode conduzir à desnaturação das proteínas, sendo que, pode afectar a sua estrutura secundária, terciária e quaternária. Os alvos principais da pressão são as ligações electrostáticas e hidrofóbicas nas moléculas de proteínas. A AP causa desprotonação dos grupos carregados, quebra das pontes salinas e ligações hidrofóbicas, resultando em alterações conformacionais e estruturais nas proteínas [49]. No entanto, as moléculas de baixo peso molecular tais como as vitaminas, os peptídeos e os lípidos não sofrem qualquer efeito na sua estrutura primária por alta pressão devido à baixa compressibilidade das ligações covalentes [57].

A AP pode activar ou inactivar enzimas, sendo, a sua inactivação por AP influenciada pelo pH, concentração de substrato, estrutura das subunidades da enzima e a temperatura aplicada durante o processo [52]. Geralmente pressões acima de 300 MPa à temperatura ambiente são suficientes para ocorrer uma inactivação irreversível na maioria das enzimas. A pressões inferiores a 200 MPa, certas enzimas são inactivadas enquanto que outras podem ser activadas [58].

Na maioria dos alimentos processados por AP a cor, o aroma e o sabor não sofrem alterações. Por outro lado, as reacções de Maillard e a formação dos compostos responsáveis pela alteração da cor também não ocorrem durante o tratamento por pressão, pois são alterações maioritariamente causadas por altas temperaturas [49, 51, 52].

3.2.3 Efeito em processos de extracção

Recentemente a AP tem sido utilizada para a extracção de compostos naturais, como por exemplo compostos fenólicos [59-62]. No processo de extracção por AP o material é em primeiro lugar misturado com solventes à temperatura ambiente numa embalagem resistente a pressão, sendo de seguida pressurizado entre 100 e 1000 MPa durante um certo tempo [59]. Com a aplicação de AP há um aumento da permeabilidade das células quando pressurizadas, levando a uma maior entrada de solvente nas células e consequentemente maior solubilização de compostos no solvente. A diferença de pressão entre o interior e exterior das membranas é tão grande que leva à permeabilização instantânea, alcançando assim, o equilíbrio de concentração entre o interior e o exterior da célula num curto espaço de tempo [60, 61].

Estudos demonstram que a extracção por AP tem muitas vantagens tais como, menor tempo de processamento, maior rendimento de extracção, menor consumo de energia, operação em temperatura ambiente, além que a actividade e a estrutura dos componentes extraídos não são geralmente prejudicados pelo processo de pressurização [59].

Num estudo feito por Zhang *et al.* [61], conseguiram-se extrair flavonóides do própolis produzido por abelhas com AP, obtendo um rendimento de extracção durante 1 minuto maior do que com o método tradicional durante 7 dias.

Em 2006, Jun Xi [62] estudou o efeito da AP na extracção de licopeno do tomate. Neste estudo, o rendimento de extracção de licopeno obtido através do processamento por AP (400 e 500 MPa) durante 1 minuto foi superior do que a obtida através de extracção tradicional com solventes durante 30 minutos. No mesmo ano Zhang *et al.* [59] conseguiram extrair com AP ginsenosides (esteróides glicosilados) da raiz da *Panax quinquefolium* L., obtendo em 2 minutos maior rendimento do que com outros métodos de extracção como o ultra-sons, em refluxo, CO₂ supercrítico e com Soxhlet.

Não existe actualmente nenhum estudo sobre a utilização AP para extracção de compostos do lúpulo, com possível utilização no processo cervejeiro.

3.3 Utilização de alta pressão no processo cervejeiro

A indústria cervejeira apesar de ter uma forte tradição é também um sector dinâmico e aberto às novas tecnologias e progressos científicos [3], sendo a produção de uma cerveja rica em XN um exemplo dessa dinâmica. Os cervejeiros estão em constante busca de novas técnicas de produção e acabamento que possibilitem um produto com melhor relação custo/eficiência e qualidade [3].

É na procura de inovação e mais qualidade no processo cervejeiro que nos últimos anos se tem estudado alguns efeitos de tratamentos com AP em etapas do processo cervejeiro como a maceração e germinação do grão de cevada [63], brassagem [64, 65], ebulição do mosto [65, 66] e na pasteurização da cerveja [3, 65-67].

Em 2001 Pérez-Lamela *et al.* [63] observaram que a utilização de AP no processo de maceração/germinação do malte aumenta a velocidade de hidratação do grão de cevada, sem causar danos ao embrião. Nesse estudo, tratamentos com pressões entre 40 a 400 MPa durante um período de 20 minutos originaram um aumento na humidade de 12% para 20% e melhoraram a distribuição de água no grão de 62% para 84% [63]. Em 2002, os mesmos autores observaram, que pressurizar os grãos de cevada, entre 200 e 600 MPa durante 20 minutos, antes da brassagem, aumenta a actividade da β -glucanase e a sacarificação, além de que a partir dos 400 MPa começa a haver gelatinização do amido [64].

Fischer *et al.* [65] em 1998 e depois Pérez-Lamela *et al.* [66] em 2004 analisaram alguns efeitos de tratamento com AP em mosto lupulado antes da ebulição. Os autores observaram que os tratamentos de AP até 600 MPa não provocaram a isomerização dos ácidos alfa, nem alterações no pH.

Em 2005, Buzrul *et al.* [3, 67] comparam o efeito da pasteurização térmica convencional (60°C durante 15 minutos) com a pasteurização a frio por AP (200 a 350 MPa durante 3 e 5 minutos), medindo parâmetros físico-químicos e microbiológicos na cerveja. Os principais atributos da cerveja, como o teor de etanol, o extracto, a cor e o pH não foram afectados pelo tratamento de AP. No entanto as amostras tratadas por AP apresentaram menor amargura e sensibilidade proteica em relação as amostras pasteurizadas termicamente. Microbiologicamente, a estabilidade da cerveja pressurizada era a mesma que a cerveja tratada termicamente [3, 67]. Os resultados apresentados podem ser vistos como base para a utilização da tecnologia de AP nas diferentes etapas do processo de fabricação de cerveja.

4. Objectivos do trabalho

1. Utilização de AP após a ebulição do mosto para extracção de compostos fenólicos do lúpulo, principalmente XN, para aumentar a sua quantidade no mosto.
2. Estudo da cinética de isomerização térmica do XN em IXN para determinar o efeito da temperatura na isomerização do XN.

Parte II. Método Experimental

1. Material utilizado e reagentes

A instrumentação utilizada ao longo da realização experimental deste trabalho encontra-se seguidamente descrita:

- Banho de ultra-sons *Fungilab- ULTRASOM CLEANER*
- Centrifugadora refrigerada, modelo *Sigma- 3K30*;
- Equipamento de Alta Pressão (U33) desenvolvido pelo Institute of High Pressure Physics - Unipress Equipment Division (2006) - número de série 1139/06, Polónia, com as seguintes características:
 - Temperatura: -20°C a 100°C
 - Pressão máxima: 700 MPa
 - Dimensões do vaso: Ø35 x 100 mm
 - Volume: 100 mL
- Máquina de vácuo, Albipack Packaging Solutions
- Colunas de extracção em fase sólida Chromabond C₁₈, 3ml, 500mg - *Macherey- Nagel*, ref:730003
- Analisador Alcoalyzer Plus Beer da Anton-Paar
- Cromatógrafo para cromatografia líquida de alta eficiência com detecção espectrofotométrica (HPLC/UV) com as seguintes características:
 - Cromatógrafo *Gilson*, modelo 321 PUMP
 - Detector UV/VIS *Gilson*, modelo UV/VIS-156
 - Integrador *Spectra- Physics*, modelo SP4290 INEGRATOR

As características da pré-coluna e das colunas utilizadas nestes sistemas cromatográficos encontram-se especificadas na Tabela 4.

Parte II- Método Experimental

Tabela 4- Características da coluna Nucleosil C₁₈ utilizada para HPLC/UV

Características	Coluna Nucleosil, C ₁₈
Fabricante	<i>Waters</i>
Comprimento	250 mm
Diâmetro interno	4,6 mm
Diâmetro de partícula	5 µm
Tamanho do poro	100 Å

As características dos diversos compostos fenólicos e dos reagentes utilizados ao longo da realização experimental deste trabalho encontram-se seguidamente descritas:

- Isoxanto-humol (C₂₁H₂₂O₅) 98% da *Alexis Biochemicals*
- Xanto-humol (C₂₁H₂₂O₅) 90% da *Hopsteiner*, fornecido pelo iBesa- Instituto de Bebidas e Saúde
- Acetonitrilo (CH₃CN) para HPLC da *LAB- SCAN*
- Metanol (CH₃OH) para HPLC da *Sigma – Aldrich*
- Ácido orto-fosfórico (H₃PO₄) 85% da *Panreac*
- Ácido fórmico (CH₂O₂) 98% da *Fluka*

As amostras de *pellets* e mosto foram gentilmente fornecidas pela Unicer Bebidas de Portugal, S.A. Os mostos “lager” e “preto” foram recolhidos da caldeira de ebulição imediatamente antes de se iniciar o processo de ebulição. As amostras de *pellets* tinham as seguintes características:

Tabela 5- Características dos *Pellets* utilizados no trabalho experimental

Tipo de lúpulo	Variedade	Concentração em ácidos alfa (%)	Produtor
<i>Pellets</i> tipo 45	<i>Czech Saaz</i>	4,0	<i>Joh. Barth & Sohn</i>

2. Metodologia aplicada

2.1 Preparação das amostras de mosto

Tendo em conta o objectivo deste trabalho experimental, procedeu-se à pressurização de mosto depois de uma fase de ebulição e lupulagem (adição de *pellets*). O procedimento realizado encontra-se descrito no seguinte esquema:

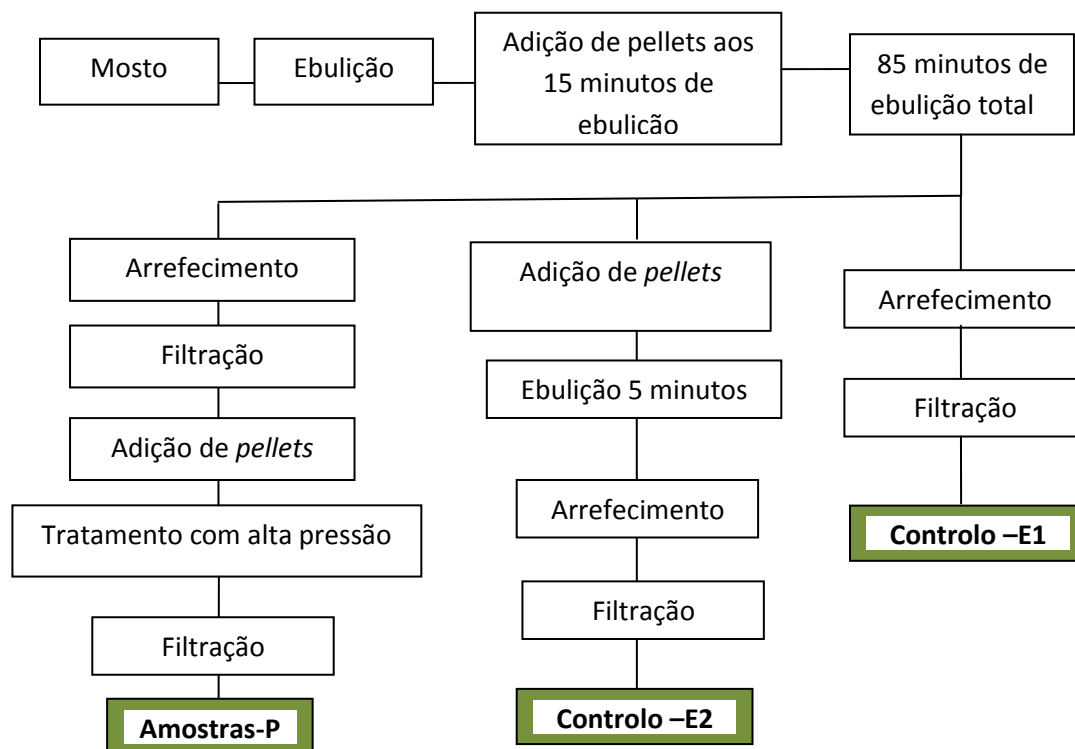


Figura 7- Esquema da metodologia aplicada para a preparação das amostras de mosto

Procedimento:

Foi colocado 250,0 mL de mosto “lager” ou “preto”, dependendo das amostras pretendidas, em balões de fundo redondo de 500 mL com três entradas (Figura 8): uma para um termómetro, outro para um condensador e o ultimo para se adicionar os *pellets*. De seguida procedeu-se a um aquecimento gradual, em manta de aquecimento, até se iniciar a ebulição.



Figura 8- Imagem fotográfica de uma ebulição de mosto “lager” no balão de fundo redondo de três entradas

Parte II- Método Experimental

Foram efectuados ensaios de controlo, ou seja sem tratamento por AP, de modo a poder comparar os efeitos da pressão na extracção e isomerização do XN em relação à extracção por ebulição do mosto. Os ensaios controlo realizados foram: controlo-E1, como uma lupulagem aos 15 minutos de ebulição (85 minutos totais de ebulição), e controlo-E2, com duas lupulagens: uma aos 15 minutos de ebulição e outra nos 5 minutos finais (90 minutos totais de ebulição). No fim de cada ebulição, o mosto foi arrefecido à temperatura ambiente no balão, sendo depois filtrado com papel de filtro de modo a remover os restos de pellets e as proteínas coaguladas.

Nos ensaios em que se efectuou pressurização, amostras-P, foram efectuados os mesmos processos de lupulagens e mantido o mesmo tempo de ebulição que no controlo-E1. De seguida, o mosto foi arrefecido à temperatura ambiente e filtrado com papel de filtro, sendo depois colocado em frascos de polietileno (36,0 mL) e efectuado mais uma lupulagem. Cada frasco de polietileno foi colocado num saco próprio para pressurizar, sendo de seguida sujeito a vácuo e selado de modo a reduzir a quantidade de ar no seu interior, para posterior pressurização.

Colocou-se um saco com o frasco no vaso de pressão e pressurizou-se a 25°C à pressão e tempo desejado, utilizando como fluído de pressurização, uma mistura de propilenoglicol/água (60:40). No fim do tempo de pressurização e da descompressão foi retirado o frasco do saco e procedeu-se a filtração do mosto com papel de filtro. Todas as amostras foram congeladas com azoto líquido e armazenadas para posterior análise.



Figura 9- Imagem fotográfica do aparelho de alta pressão utilizado no trabalho experimental.

Os tratamentos AP foram realizados no aparelho Unipress Equipment, Modelo U33 presente na Universidade de Aveiro (Figura 9). O vaso de pressurização do aparelho tem um revestimento externo ligado a um banho de termostatização para controlo de temperatura.

Relativamente às amostras com duas lupulagens, foram realizados dois ensaios distintos que se diferenciaram pela quantidade de *pellets* adicionado ao mosto. No primeiro ensaio (ensaio1) adicionou-se a mesma quantidade de *pellets* nas duas lupulagem. No segundo ensaio (ensaio 3x*pellets*) foi adicionado na segunda lupulagem três vez mais *pellets* do que a adicionada na primeira lupulagem. As dosagens de *pellets* efectuadas em cada ensaio encontram-se resumidas na Tabela 6.

Tabela 6 - Dosagem dos *pellets* nos diferentes ensaios realizados

	Lupulagem	Dosagem de <i>pellets</i> (g/L)
Controlo-E1	1 ^a	2,4
Ensaio 1	1 ^a	2,4
	2 ^a	2,4
	Total	4,8
Controlo-E2		
Ensaio 3x <i>pellets</i>	1 ^a	2,4
	2 ^a	7,2
	Total	9,6
Ensaio 1	1 ^a	2,4
	2 ^a	2,4
	Total	4,8
Amostras-P		
Ensaio 3x <i>pellets</i>	1 ^a	2,4
	2 ^a	7,2
	Total	9,6

2.2 Análise quantitativa de XN e IXN por HPLC/UV

A quantificação do XN e do IXN presente em todas as amostras foi feita por HPLC/UV pelo método de padrão externo, partindo de rectas de calibração de XN e IXN. Para isso, procedeu-se à preparação de soluções padrão de XN e IXN, em metanol, tendo em vista a realização de curvas de calibração por HPLC/UV, nas quais se representa a resposta instrumental em função da concentração de padrão. Na preparação das soluções de XN ao longo da realização experimental, teve-se o cuidado das proteger da acção da luz e da exposição a elevadas temperaturas, a fim de evitar a possível isomerização. As análises foram realizadas em duplicado.

Para a quantificação do XN e IXN de todos os ensaios foram utilizadas as condições cromatográficas desenvolvidas por Magalhães. *et al.*[8], envolvendo os seguintes passos:

- Fase estacionária: coluna C₁₈ (ver características da fase estacionária na Tabela 4);
- Fase móvel constituída por (A) H₂O (1% CH₂O₂) e (B) CH₃CN a um fluxo constante de 0,800 mL.min⁻¹ nas seguintes condições de gradiente:
 - 0 a 15 minutos – aumento linear do gradiente de solvente de 40 % de B e 60 % de A até 100 % B

Parte II- Método Experimental

- 15 a 20 minutos manter 100 % de B;

- Comprimentos de onda de detecção: IXN = 290 nm; XN = 370 nm.

2.3 Quantificação do XN e IXN nos *Pellets* tipo 45

Procedeu-se à determinação do teor de XN e IXN existente nos *pellets* 45 baseando-se no método de cromatografia líquida com extracção prévia do XN e IXN com ultra-sons desenvolvido por Stevens *et al.* [28] e posteriormente melhorada por Magalhães *et al.* [8].

Procedimento:

Foram triturados cerca de 3 g de *pellets* num almofariz, sendo depois retirada uma amostra de 0,100 g para extracção com 10,0 mL de metanol em ultra-sons durante 10 minutos seguido de uma centrifugação durante 5 minutos a uma velocidade de 3500 g. Com o precipitado procedeu-se a uma nova extracção com 10,0 mL de metanol no ultra-sons durante 10 minutos, sendo posteriormente, filtrado os dois extractos combinado com um filtro de *nylon* (0,2 µm) e homogeneizado no vortex. Uma alíquota de filtrado, 5,0 mL, foi diluída num balão volumétrico de 50,0 mL com uma mistura de metanol/ ácido fórmico (99:1). Quantificou-se o XN e IXN por HPLC/UV.

2.4 Análise do teor de XN e IXN presente nas amostras de mosto

Procedeu-se à determinação do teor de XN e IXN existente nas amostras de mosto baseando-se no método de cromatografia líquida com extracção prévia do XN e IXN em colunas de fase sólida (C₁₈) desenvolvido por Magalhães *et al.* [45].

Procedimento:

Foram desgaseificados 20 mL de mosto em ultra-sons durante 5 minutos, sendo depois acidificados com 0,1 mL de ácido *orto*-fosfórico 85%. Seguidamente passou-se à extracção e concentração em coluna de fase sólida C₁₈, envolvendo os seguintes passos:

- i. Condicionamento da coluna – eluição com 3,0 mL de metanol, seguidos pela eluição de 3,0 mL de solução A (0,2 mL de ácido *orto*-fosfórico 85% + 50,0 mL de água ultra-pura + 50,0 mL de metanol);

- ii. Retenção – esta etapa consistiu na eluição de 20,0 mL de amostra de mosto previamente desgaseificada e acidificada, seguida de um passo de secagem com azoto durante 2 minutos;
- iii. Lavagem da coluna – após a eluição da amostra, fez-se passar 12,0 mL de solução B (0,2 mL ácido *orto*-fosfórico 85% + 100,0 mL de água ultra-pura) e de seguida secou-se novamente a coluna durante 2 minutos;
- iv. Eluição - consistiu na passagem de 3,0 mL de solução C (0,1 mL ácido *orto*-fosfórico 85% + 90,0 mL de metanol + 10,0 mL de água ultra-pura) e recolha da mesma.

Os extractos foram analisados por HPLC/UV, sendo que para a análise quantitativa do IXN, os extractos foram diluídos 11 vezes com solução C a fim de obter concentrações de IXN dentro da recta de calibração.

2.5 Estudo da cinética de isomerização térmica do XN a IXN num sistema modelo

Este estudo teve como objectivo o cálculo das constantes cinéticas de isomerização (k), o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) e o tempo de redução decimal (D) do XN num sistema modelo a 100 °C, 90 °C e 80 °C e por último a respectiva energia de activação (E_a) da reacção e o factor de sensibilidade do XN à temperatura (z). Foi usado um sistema modelo com 10% de sacarose e pH 5,5 de modo a simular a quantidade de açúcar e o pH do mosto.

A velocidade média da reacção pode definir-se como a alteração da concentração do XN num dado intervalo de tempo. Como se verificou que a isomerização do XN a IXN seguia uma cinética de 1ª ordem, a Equação 1 foi usada para calcular as constante cinéticas de isomerização para cada temperatura, “ k ” [68].

$$\ln\left(\frac{x}{x_0}\right) = -kt \quad \text{Eq.1}$$

Onde “ x ” representa a concentração de XN (mg/L) quantificado a um determinado tempo; “ x_0 ” a concentração de XN inicial (mg/L); “ k ” a constante cinética (min^{-1}) e “ t ” o tempo em que ocorre a isomerização (min).

Depois de se obterem as constantes cinéticas calculou-se os tempos de meia vida e os tempos de redução decimal do XN para cada temperatura. O $t_{1/2}$ é o tempo necessário para reduzir a concentração para metade, sendo calculada a partir da seguinte equação [68]:

Parte II- Método Experimental

$$t_{1/2} = \frac{\ln(0,5)}{-k} \quad \text{Eq. 2}$$

Onde “k” a constante cinética (min^{-1}) e “ $t_{1/2}$ ” o tempo em que ocorre a isomerização (min).

O D é o tempo (min) necessário para reduzir a concentração, neste caso do XN, de um ciclo logarítmico (para 10% do valor inicial) a determinada temperatura, sendo calculada a partir da seguinte equação [68]:

$$D = \frac{\ln(10)}{k} \quad \text{Eq.3}$$

Onde “k” a constante de velocidade (min^{-1}) e “D” o tempo de redução decimal (min).

O z indica a sensibilidade à temperatura, ou seja, o aumento/diminuição de temperatura que resulta numa diminuição/aumento de um D, sendo calculada através da Equação 4, que traduz uma relação linear entre $\log(D)$ e T, sendo o declive da recta igual a $-1/z$ e a ordenada na origem $\log(D_{\text{ref}})$ [69]:

$$\text{Log}(D) = \text{Log}(D_{\text{ref}}) + \frac{T_{\text{ref}} - T}{z} \quad \text{Eq.4}$$

Onde “D” o tempo de redução decimal (min); “ D_{ref} ” o valor de D a uma temperatura referência (min); “T” a temperatura (K); “ T_{ref} ” uma temperatura referência (K) e “z” o indicador da sensibilidade à temperatura.

Calculou-se a energia de activação através da equação de Arrhenius (Eq.5) que traduz uma relação linear entre $\ln(k)$ e $1/T$, sendo o declive da recta igual a $-E_a/R$ e a ordenada na origem o $\ln A$ [68].

$$\ln(k) = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad \text{Eq.5}$$

Onde “k” representa a constante cinética (min^{-1}); “A” o factor pré-exponencial de Arrhenius; “ E_a ” a energia de activação (J.mol^{-1}); “R” a constante dos gases perfeitos ($\text{J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$) e “T” a temperatura (K).

O estudo da cinética de isomerização térmica num sistema modelo baseou-se num método desenvolvido por Stevens *et al.* [43].

Procedimento:

Dissolveu-se 10,0 g de sacarose numa mistura de 10,0 mL de solução tampão de acetato de amónio 0,1M a pH 5,5 e 50,0 mL de água destilada, sendo, de seguida, colocado num balão volumétrico de 100,0 mL e aferido o volume com água destilada. Retirou-se 10,0 ml da solução

para um tubo de ensaio fechado e posto a estabilizar durante 15 minutos no banho a temperatura pretendida. Adicionou-se 400 μL de uma solução de 500 mg/L de XN (solução em metanol), sendo depois retiradas alíquotas nos tempos desejados e deixado arrefecer a temperatura ambiente para posterior análise em duplicado por HPLC/UV. Sempre que necessário as amostras foram diluídas com a solução modelo a fim de obter concentrações de XN e IXN dentro da recta de calibração. As amostras para $t=0$ minutos foram preparadas juntando 100 μL de solução de XN a 2,5 mL de solução modelo.

2.6 Análises físico-químicas do mosto

Caracterização físico-química das amostras de mosto e cerveja foram realizadas no laboratório central da empresa UNICER – Bebidas de Portugal, S.A. Para as amostras de mosto foi analisado o pH, a cor, o amargor e o extracto real.

O pH, cor e extracto real das amostras do mosto foram medidos com um analisador Alcolyzer Plus Beer da Anton-Paar (Figura 10). Antes de analisar estes parâmetros, as amostras de mosto foram previamente filtradas com um papel de filtro contendo *Kieselguhr* (1 a 2 gramas por litro de amostra), para tirar a turvação. Depois desta preparação as amostras foram colocadas numa célula cilíndrica no analisador, sendo os parâmetros físico-químicos fornecidos pelo aparelho por comparação com amostras padrões.



Figura 10 – Imagem fotográfica do Alcolyzer Plus Beer utilizado no trabalho experimental

O amargor do mosto foi determinado pelo método 8.8 do *Analytica-EBC* [70], recomendado pelo European Brewery Convention. As amostras foram previamente filtradas com papel de filtro, sendo depois retirada uma alíquota de 10,0 mL para acidificação com 0,5 mL de ácido clorídrico 6 M. De seguida, foram adicionados 20,0 mL de iso-octano e colocado sob agitação durante 15 minutos, extraindo assim os compostos amargos do mosto acidificado para o iso-octano. As amostras foram por fim, analisadas em cuvetes de 10 mm de percurso óptico por espectrofotometria de ultravioleta a 275 nm. O amargor das amostras é expresso em unidade de amargor (UA), sendo esse valor o resultado da absorvência medida multiplicado por 50.

Parte III. Resultados e discussão

De maneira a otimizar o registo e tratamento dos resultados experimentais, esta secção encontra-se dividida em duas partes. A primeira parte descreve os resultados obtidos no estudo da utilização de AP após a ebulição do mosto para extracção do XN. A segunda parte descreve os resultados obtidos no estudo da cinética de isomerização térmica do XN em IXN.

1. Utilização de alta pressão após a ebulição do mosto para extracção do XN

Como já foi referido anteriormente, pretendeu-se com este trabalho experimental aumentar o teor de XN no mosto com aplicação de AP depois da fase de ebulição do mosto. Para tal foi necessário primeiramente efectuar rectas de calibração de XN e IXN para se poder quantificar estes dois compostos nas amostras estudadas.

1.1 Rectas de calibração do XN e IXN

Os valores de área de pico cromatográfico e respectivos tempos de retenção obtidos após injeção de cada solução padrão de XN estão resumidos na Tabela 7.

Tabela 7 – Valores de área do pico e tempo de retenção obtidos por análise de soluções padrão de XN por HPLC/UV

[XN] (mg/L)	Ensaio 1		Ensaio 2		Média das áreas	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)
	Área de pico de XN	Tempo de retenção (min)	Área de pico de XN	Tempo de retenção (min)			
1,00	153636	12,46	160106	12,41	156871	4575,0	2,9
2,00	297087	12,35	292984	12,61	295036	2901,3	1,0
3,00	450471	12,43	480757	12,68	465614	21415,4	4,6
4,00	586723	12,39	620504	12,37	603614	23886,8	4,0
5,00	773240	12,67	765091	12,39	769166	5762,2	0,7
6,00	918427	12,45	917770	12,35	918098	464,6	0,1

Parte III. Resultados e Discussão

Analisando a Tabela 7, observa-se o aumento de área de um pico cromatográfico, com o tempo de retenção de $\approx 12,4$ minutos, à medida que são analisadas soluções padrões com concentrações crescentes de XN. Com este aumento de pico cromatográfico e com base na literatura existente [8, 28], pode-se concluir que este pico corresponde ao XN.

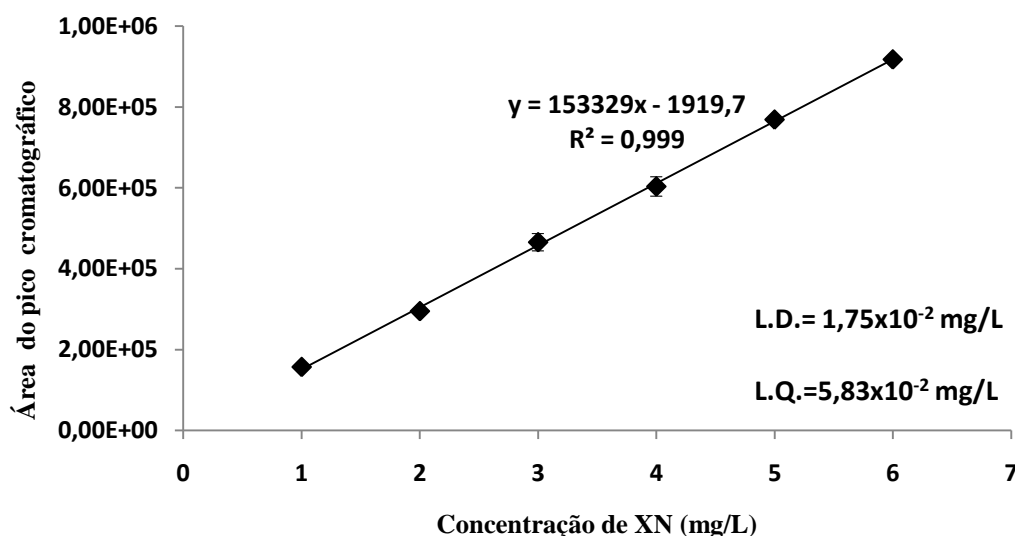


Gráfico 1- Recta de calibração obtida para o XN (em todos os gráficos os pontos referem-se ao valor médio experimental obtido e as barras de erro representam o respectivo desvio padrão)

A representação gráfica dos valores das áreas dos sinais cromatográficos em função da concentração de XN (Gráfico 1) permite verificar uma boa correlação linear ($R^2 = 0,999$) entre os referidos parâmetros. Obtiveram-se ainda baixos limites de detecção (L.D.) – $1,75 \times 10^{-2}$ mg/L e quantificação (L.Q.) – $5,83 \times 10^{-2}$ mg/L.

O limite de detecção e o limite de quantificação foram calculados de acordo com as recomendações da IUPAC [71] (L.D. e o L.Q. são definidos, respectivamente, como a concentração do analito que produz um sinal de 3 e 10 vezes a razão ruído/sinal do equipamento).

Relativamente ao IXN, os valores de área de pico e respectivos tempos de retenção obtidos após injeção de cada solução estão resumidos na tabela seguinte.

Tabela 8- Valores de área de pico e tempo de retenção obtidos por análise de soluções padrão de IXN por HPLC/UV

[IXN] (mg/L)	Ensaio 1		Ensaio 2		Média das áreas	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)
	Área de pico de IXN	Tempo de retenção (min)	Área de pico de IXN	Tempo de retenção (min)			
1,00	12578	8,43	12107	8,15	12342	333,0	2,7
2,00	25889	8,12	25008	8,82	25448	623,0	2,4
3,00	37449	8,13	36864	8,17	37156	413,7	1,1
4,00	50042	8,18	51385	8,14	50714	949,6	1,9
5,00	62988	8,13	64889	8,13	63938	1344,2	2,1
6,00	71072	8,15	73252	8,09	72162	1541,5	2,1

Conforme seria de esperar, para cada injeção das soluções padrão no sistema cromatográfico verificou-se o aparecimento de um sinal com um tempo de retenção característico ($\approx 8,2$ min), cuja intensidade aumentou com o aumento da concentração do IXN na solução injectada. Com este aumento de pico cromatográfico e com base na literatura existente [8, 28], pode-se admitir que este pico corresponde ao IXN.

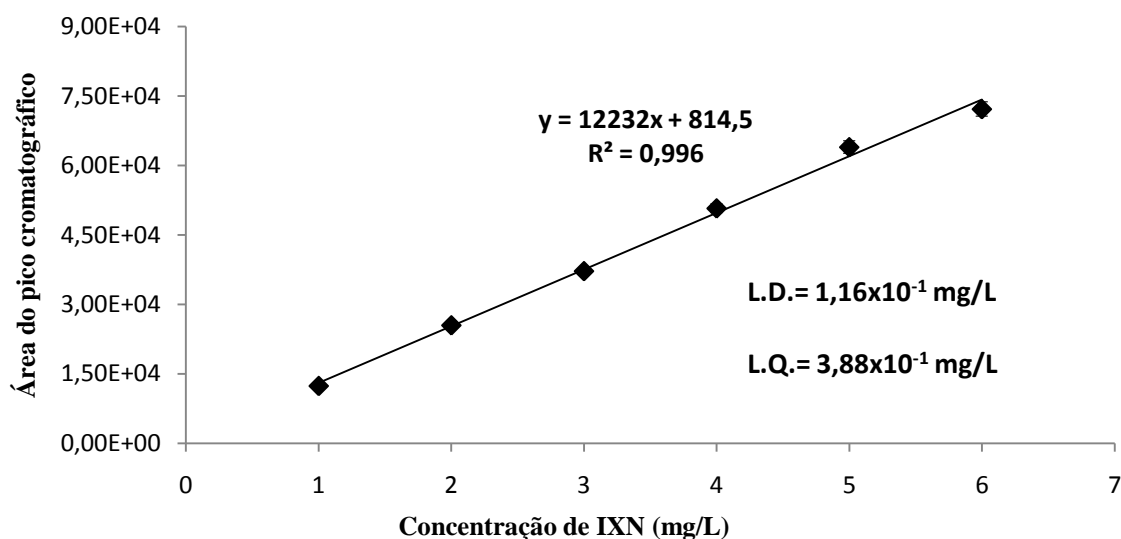


Gráfico 2- Curva de calibração obtida para o IXN

Parte III. Resultados e Discussão

A representação gráfica dos valores das áreas dos sinais cromatográficos em função da concentração de IXN permitiu verificar uma boa correlação linear ($R^2 = 0,996$) entre os referidos parâmetros. Obtiveram-se ainda como limites de detecção - $1,16 \times 10^{-1}$ mg/L e quantificação - $3,88 \times 10^{-1}$ mg/L (calculados de acordo com as recomendações da IUPAC [71], como referido anteriormente).

As equações das rectas de calibração do XN e IXN obtidas pelo método de padrão externo, bem como a correlação linear e os limites de detecção e quantificação, encontram-se resumidos na Tabela 9.

Tabela 9- Equações das rectas de calibração do XN e IXN, correlação linear e limites de detecção correspondentes

	Equação da curva ($y = ax + b$)	R^2	L.D. (mg/L)	L.Q. (mg/L)
Xanto-humol	$y = 153329x + 1919,7$	0,999	$1,75 \times 10^{-2}$	$5,83 \times 10^{-2}$
Isoxanto-humol	$y = 12232x + 814,5$	0,996	$1,16 \times 10^{-1}$	$3,88 \times 10^{-1}$

1.2 Quantificação do teor de XN e IXN nos *Pellets* tipo 45

Depois desta fase inicial de implementação do método de determinação de XN e IXN, foi quantificado o teor de XN e IXN presente nos *pellets* tipo 45. É fundamental a quantificação do XN e IXN presente nos *pellets*, visto que, apenas deste modo se pode calcular a quantidade destes compostos que é adicionado ao mosto na fase de ebulição e consequentemente, a quantidade de XN que é perdida e a quantidade de IXN que é formada durante o processo. Como já foi referido anteriormente, a metodologia usada para a quantificação do teor do XN e IXN baseia-se num método de cromatografia líquida com extracção prévia do XN e IXN com ultra-sons desenvolvido por Stevens *et al.* [28] e posteriormente melhorada por Magalhaes *et al.* [8].

As áreas dos sinais cromatográficos do IXN e XN obtidas, os respectivos tempos de retenção, bem como o teor nas amostras de *pellets* encontram-se resumidos nas tabelas 10 e 11, respectivamente. A % m/m de XN foi calculada tendo em conta a pureza do XN usado para a elaboração das soluções padrões.

Tabela 10- Valores de IXN obtidos da análise por HPLC/UV dos extractos de *pellets*

	Ensaio	
	1	2
Área de isoxanto-humol no extracto	348	412
Tempo de retenção (min)	8,30	8,31
Isoxanto-humol (% m/m)	< L.D.	< L.D.
Média (%m/m)	< L.D.	

Analizando a Tabela 10, pode-se observar que não se conseguiu quantificar o teor de IXN, visto que se obteve picos cromatográficos com tempo de retenção característico do IXN ($\approx 8,2$ min) abaixo dos limites de detecção da recta de calibração do composto. A partir da pesquisa bibliográfica foi possível constatar que o teor de IXN nas *pellets* é praticamente insignificante [8, 16], visto que este composto resulta da isomerização térmica do XN durante o processo de fabricação de cerveja, como referido anteriormente. Portanto, a inexistência de IXN ou as baixas concentrações em que este composto poderá existir no lúpulo poderão explicar a não identificação deste polifenol na amostra.

Tabela 11- Valores de XN obtidos da análise por HPLC/UV dos extractos de *pellets*

	Ensaio	
	1	2
Área de xanto-humol no extracto	312320	314685
Tempo de retenção (min)	12,45	12,41
Xanto-humol (% m/m)	$3,69 \times 10^{-1}$	$3,72 \times 10^{-1}$
Média, %m/m (desvio padrão)	$3,70 \times 10^{-1}$ ($2,18 \times 10^{-3}$)	
Coefficiente de variação (%)	0,5	

Parte III. Resultados e Discussão

Analisando a tabela 11 observa-se que os *pellets* tipo 45 de variedade *Czech Saaz* utilizados neste trabalho experimental apresentaram um teor de XN 0,370 (0,002) %m/m (entre parêntesis é apresentado o desvio padrão). O teor calculado de XN encontra-se na gama de teores de XN encontrados em lúpulo, 0,1-1,1% m/m (peso seco) [1], sendo esse valor dependente da variedade do lúpulo e local de cultivo.

É possível a ocorrência de perdas do XN durante a extracção das amostras, que poderá ser devido por exemplo, a adsorção do XN ao filtro de *nylon* durante a filtração realizada no tratamento da amostra. Sendo assim, foi estudado a influência dessas perdas na quantificação do XN nos *pellets*. Para isso foi realizado um ensaio de comparação entre uma amostra de *pellets* em que se adicionou uma concentração conhecida de XN com uma amostra de *pellets* em que não se adicionou XN. A percentagem de recuperação foi calculada pela razão entre o incremento de área obtido e o incremento de área esperado. O incremento de área obtido foi calculado pela diferença entre a área do sinal cromatográfico do XN na amostra em que se adicionou XN e a área do sinal da amostra em que não se adicionou XN. O incremento de área esperado corresponde ao incremento da área que ocorreria se todo o XN adicionado fosse recuperado. As quantidades de XN adicionadas às amostras de *pellets*, as áreas dos sinais cromatográficos do XN obtidas, os incrementos de área esperado e obtido e a percentagem de recuperação do XN encontram-se resumidas na Tabela 12.

Tabela 12- Valores das áreas de pico obtidos para a quantificação do factor de recuperação do XN

	Ensaio			
	1	2	1	2
[XN] _{adicionado} (mg/L)	0	0	3,0	3,0
Área de xanto-humol no extracto	218875	220245	652755	655010
Média				
	219560		653883	
Incremento de área obtido		434323		
Incremento de área esperado		456791		
% de Recuperação		95,1		

Pela análise da Tabela 12, pode-se constatar que a taxa de recuperação obtida para o XN foi bastante elevada (95%), o que permite concluir que o método utilizado é eficiente.

1.3 Pressurização do mosto

Depois da fase de quantificação do teor do XN e IXN nos *pellets* foram iniciados os primeiros ensaios envolvendo AP para aumentar o teor de XN no mosto. Primeiramente, foi avaliado o efeito de diferentes pressões e tempos de pressurização na extracção de XN, de modo a otimizar o processo de extracção. Seguidamente, foram escolhidas as gamas de pressão/tempo com valores de extracção mais elevados e aplicados em mosto “lager” mas com uma adição de *pellets*, antes da pressurização, três vezes mais elevada que nos testes de optimização tempo/pressão. Por último, foram aplicadas as gamas de pressão/tempo optimizadas em mosto “preto”.

Tanto para as amostras controlo, como para as amostras pressurizadas que demonstraram teores de XN mais elevados, foram quantificados alguns dos principais parâmetros físico-químicos do mosto entre os quais o amargor, extracto e pH, de modo a verificar a qualidade das amostras.

1.3.1 Efeito de diferentes tempos de pressurização na extracção de XN

A fim de estudar o efeito de diferentes tempos de pressurização na extracção de XN dos *pellets* depois da etapa de ebulição foram escolhidas duas pressões, 250 e 400 MPa, e três tempos de pressurização distintos, 5 minutos, 15 minutos e ciclos de três vezes 5 minutos, num total de seis ensaios (amostras-P). Como referido anteriormente no ponto 2.1 da metodologia aplicada, foram também realizados para este teste dois ensaios de controlo: controlo-E1 e controlo-E2, de modo a analisar melhor o efeito AP no processo. O controlo-E1 caracteriza o processo de ebulição do mosto tradicionalmente utilizado na indústria cervejeira, ou seja, com uma lupulagem no início da ebulição. O controlo-E2 caracteriza um processo de ebulição do mosto mais recente, utilizado para produzir cervejas com teor de XN mais elevadas. Este controlo apresenta duas lupulagens: uma no início da ebulição do mosto e outra nos minutos finais da ebulição.

As dosagens de cada lupulagem efectuada nas amostras, bem como as respectivas concentrações de ácidos alfa (considerando os valores indicado pelo fornecedor dos *pellets*) e XN (considerando os valores de XN determinados, anteriormente, nos *pellets*) encontram se resumidos na Tabela 13. As concentrações de XN indicados na tabela seriam os valores esperados nas amostras de mosto, no caso de uma extracção completa e sem isomerização do XN. Na Tabela 14 encontram-se resumidos o teor de XN, IXN e XN+IXN presentes nas amostras de mosto tratado, bem como os desvios padrões e os coeficientes de variação (n=2).

Parte III. Resultados e Discussão

Tabela 13- Dosagem dos *pellets* nos ensaios realizados para otimização da gama tempo/pressão, bem como as respectivas concentrações de ácidos alfa e XN

	Dosagem (g/L)	Ácidos alfa (mg/L)	XN (mg/L)
Controlo - E1	2,4 ^a	96	8,8
Controlo - E2	2,4 ^a	96	8,8
	2,4 ^b	96	8,8
	Total 4,8	192	17,6
	2,4 ^a	96	8,8
Amostras -P	2,4 ^c	96	8,8
	Total 4,8	192	17,6

^a Adição dos *pellets* 15 minutos depois do início da ebulição; ^b Adição dos *pellets* aos 85 minutos de ebulição; ^c Adição dos *pellets* antes da pressurização.

Tabela 14- Valores do teor de XN, IXN e XN+IXN presentes nas amostras de mosto controlo pressurizadas a 250 e 400 MPa durante 5, 15 e 3 vezes 5 minutos, bem como os correspondentes desvios padrões e coeficientes de variação.

Amostras de mosto “lager”		Teor de XN (mg/L)	Teor de IXN (mg/L)	Teor de XN+IXN (mg/L)
		(Desvio padrão/Coefficiente de variação (%))		
Controlos	E1	0,195 (0,004/2,1)	1,694 (0,046/2,7)	1,889 (0,050/2,6)
	E2	0,394 (0,009/2,4)	4,542 (0,396/8,7)	4,935 (0,405/8,2)
Amostras -P	250MPa 5min	0,808 (0,024/3,0)	1,674 (0,033/1,9)	2,483 (0,056/2,3)
	250MPa 15min	0,632 (0,028/4,4)	2,113 (0,080/3,8)	2,745 (0,108/3,9)
	250MPa 3x5min	0,583 (0,010/1,7)	2,869 (0,131/4,6)	3,452 (0,121/3,5)
	400MPa 5min	0,628 (0,018/2,9)	2,349 (0,059/2,5)	2,977 (0,041/1,4)
	400MPa 15min	0,499 (0,002/0,4)	3,617 (0,118/3,2)	4,116 (0,115/2,8)
	400MPa 3x5min	0,469 (0,024/5,1)	1,722 (0,091/5,3)	2,191 (0,115/5,3)

Os gráficos 3, 4 e 5 apresentam, respectivamente, os valores do teor de XN, IXN e XN+IXN nas amostras controles e pressurizadas a 250 e 400 MPa durante 5, 15 e três vezes 5 minutos.

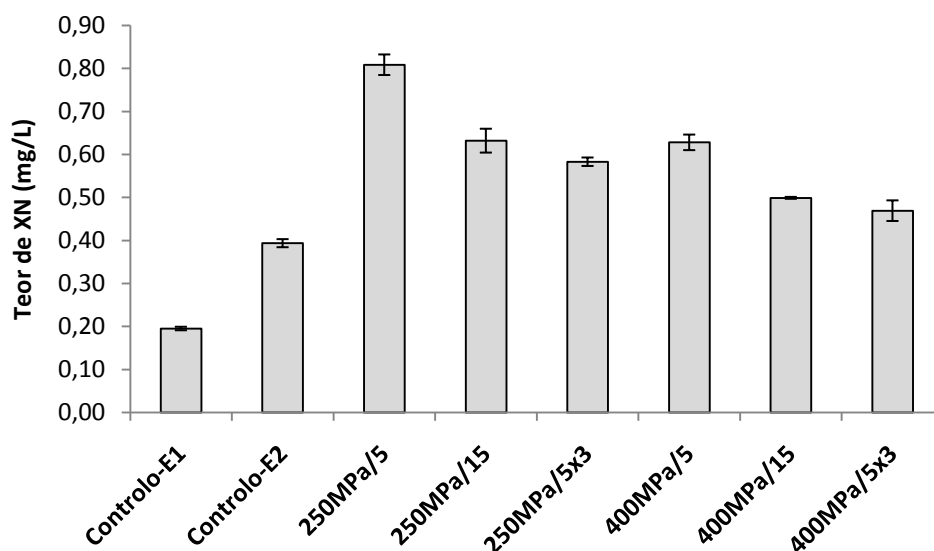


Gráfico 3- Representação do teor de XN (mg/L) presente nas amostras de mosto pressurizadas a 250 e 400MPa durante 5, 15 e três vezes 5 minutos e controlos.

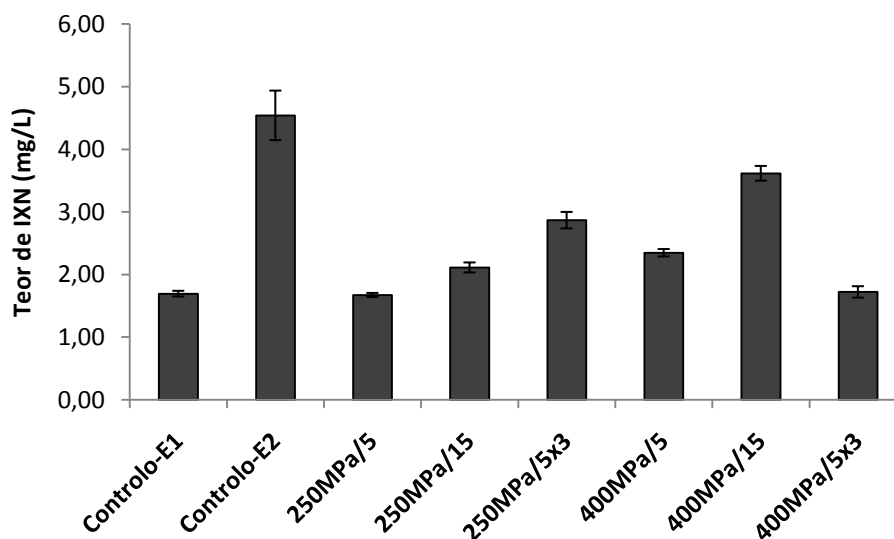


Gráfico 4- Representação do teor de IXN (mg/L) presente nas amostras de mosto pressurizadas a 250 e 400MPa durante 5, 15 e três vezes 5 minutos e controlos.

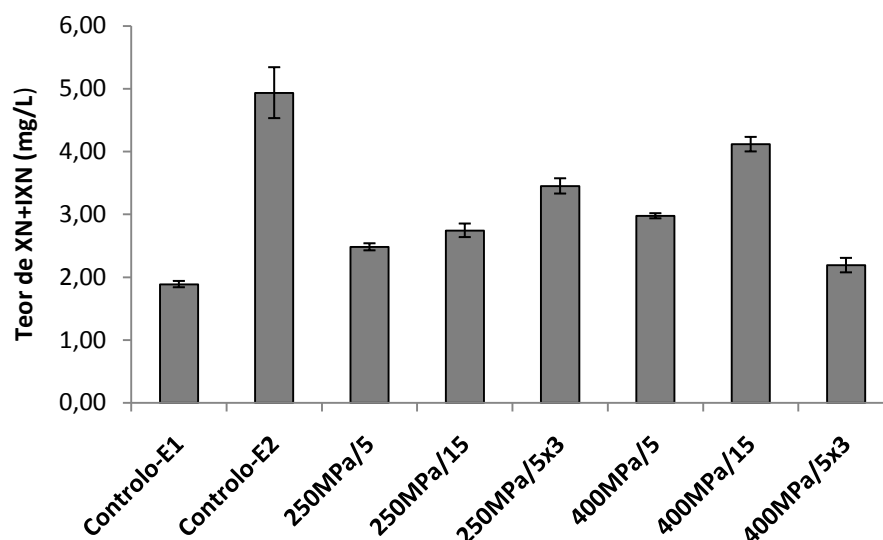


Gráfico 5- Representação do teor de XN+ IXN (mg/L) presente nas amostras de mosto pressurizadas a 250 e 400 MPa durante 5, 15 e três vezes 5 minutos e controlos.

Observando o Gráfico 3, verifica-se que todas as amostras de mosto pressurizadas apresentam um teor de XN mais elevado que as amostras que não sofreram pressurização, ou seja, conseguiu-se extrair XN dos *pellets* para o mosto. Este resultado poderá ser devido ao facto de que com a aplicação de AP, houve um aumento da permeabilidade das células do lúpulo quando pressurizadas, levando a uma maior entrada de mosto nas células e consequentemente maior



Figura 11- Imagem fotográfica de amostras de mosto “lager” depois (A) e antes de ser pressurizado (B)

solubilização do XN. Este efeito pode ser verificado na Figura 11 que ilustra duas amostras de mosto, sendo uma delas antes de pressurização (B) e outra depois da pressurização (A) em que se pode analisar as diferenças no comportamento dos *pellets* antes e depois do processo de pressurização. Ao observar a figura ao lado é perceptível que antes da pressurização, os *pellets* formam agregados (que flutuam) quando entram em contacto com o mosto, sendo que depois da pressurização os *pellets* ficam mais densos e

separados (sedimentam). Estes resultados indicam que houve entrada de mosto nos *pellets*, rompendo assim as paredes celulares das células, ficando as folhas mais hidratadas.

Os melhores resultados foram obtidos para pressurizações de 5 minutos, sendo possível observar, tanto para 250 MPa como para 400 MPa, um decréscimo do teor de XN, com o aumento do tempo de pressurização de 5 para 15 minutos (com um ciclo de pressurização ou com 3 ciclos de 5 minutos). Estes valores vão ao encontro dos resultados encontrados na literatura [59, 61, 62], em que obtêm-se melhores resultados de extracção com tempos de pressurização baixos (1 a 5 minutos). Dentro das amostras pressurizadas, obteve-se os teores de XN mais baixos nas amostras pressurizadas em ciclos de 5 minutos.

Apesar de se observar, no Gráfico 4, teores de IXN mais baixos para as amostras-P em relação ao controlo-E2, observa-se que há alguma isomerização do XN em IXN com aplicação das gamas tempo/pressão efectuadas. Pode-se verificar que as amostras-P (com excepção da amostra pressurizada a 250 MPa, 5 minutos) apresentam teores de IXN um pouco superiores ao controlo-E1 o que indica que houve isomerização do XN proveniente da segunda adição dos *pellets* antes da pressurização. No entanto observa-se que para as amostras pressurizadas, excluindo a amostra 400 MPa/3x5, quanto maior é o teor de XN no mosto, menor é o teor de IXN. Este comportamento é esperado, visto que, maior teor de IXN implica isomerização do XN e a consequentemente diminuição do teor do mesmo. A amostra 400 MPa/3x5 demonstra um comportamento diferente, visto apresentar um teor de IXN e XN mais baixo. Possivelmente este comportamento é resultado desta amostra ter “sofrido” um processamento mais forte, o que pode ter provocado tanto a degradação do XN como do IXN. Observando o Gráfico 5, verifica-se que o controlo-E2 apresenta o valor total de XN e IXN mais elevado. Esse teor elevado indica que houve nos 5 minutos de ebulição depois da segunda lupulagem uma elevada extracção de XN dos *pellets* para o mosto, mas que grande parte desse XN foi isomerizado em IXN, ficando o teor de XN mais baixo que nas amostras-P.

Com este estudo pode-se então concluir que o tempo de pressurização de 5 minutos, é entre os tempos de pressurização estudados, o mais adequado para extrair XN com baixos valores de isomerização

1.3.2 Efeito de diferentes pressões na extracção de XN

Depois de se ter verificado que 5 minutos era tempo de pressurização mais adequado e que existiam diferenças no teor de XN no mosto quando pressurizado a 250 ou a 400 MPa, foi estudado o efeito de diferentes pressões na extracção de XN. As amostras foram portanto pressurizadas a 100, 200, 300 e 500 MPa durante 5 minutos (amostras-P/5min), tendo já sido pressurizadas as amostras a 250 e 400 MPa aquando do estudo acabado de apresentar.

Na Tabela 15 encontram-se resumidos o teor de XN, IXN e a soma deles presentes nas amostras de mosto tratado, bem como os desvios padrões e os coeficientes de variação (n=2).

Tabela 15- Valores do teor de XN, IXN e XN+IXN presentes nas amostras de mosto controlo e pressurizadas a 100, 200, 250, 300, 400 e 500 MPa durante 5 minutos, bem como os correspondentes desvios padrões e coeficientes de variação.

Amostras de mosto “lager”		Teor de XN (mg/L)	Teor de IXN (mg/L)	Teor de XN+IXN (mg/L)
		(Desvio padrão/Coefficiente de variação (%))		
Controlos	E1	0,195 (0,004/2,1)	1,694 (0,046/2,7)	1,889 (0,050/2,6)
	E2	0,394 (0,009/2,4)	4,542 (0,396/8,7)	4,935 (0,405/8,2)
Amostras –P	100MPa 5min	0,577 (0,008/1,4)	3,049 (0,019/0,6)	3,931 (0,027/0,7)
	200MPa 5min	0,763 (0,003/0,4)	1,943 (0,081/4,2)	2,706 (0,079/2,9)
	250MPa 5min	0,808 (0,024/3,0)	1,674 (0,033/1,9)	2,483 (0,056/2,3)
	300MPa 5min	0,717 (0,004/0,5)	2,316 (0,078/3,4)	3,033 (0,074/2,5)
	400MPa 5min	0,628 (0,018/2,9)	2,349 (0,059/2,5)	2,977 (0,041/1,4)
	500MPa 5min	0,482 (0,014/2,9)	1,560 (0,114/7,3)	2,042 (0,101/4,9)

Os gráficos 6, 7 e 8 apresentam os valores do teor de XN, IXN e a soma deles, respectivamente, nas amostras controlos e pressurizadas a 100, 200, 250, 300, 400 e 500 MPa durante 5 minutos.

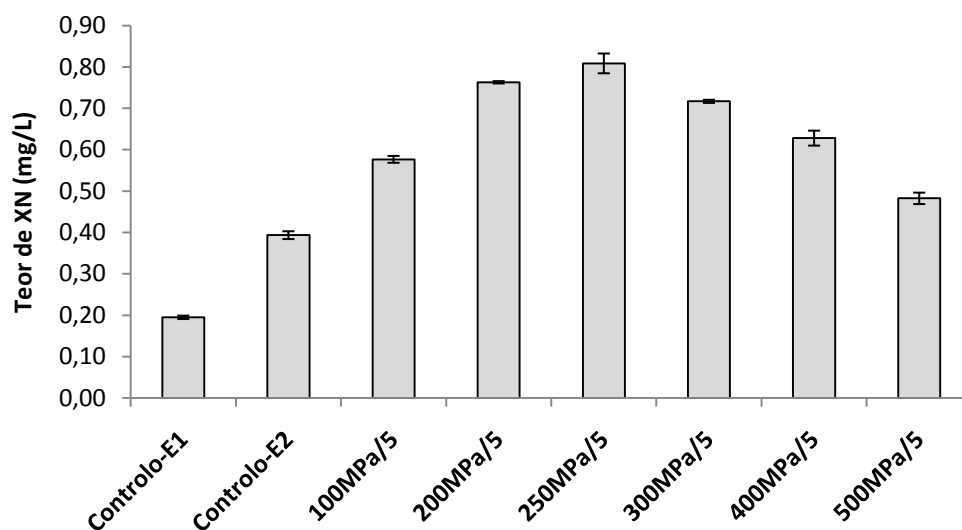


Gráfico 6- Representação do teor de XN (mg/L) presente nas amostras de mosto pressurizadas a 100, 200, 250, 300, 400 e 500MPa durante 5 minutos e controlos

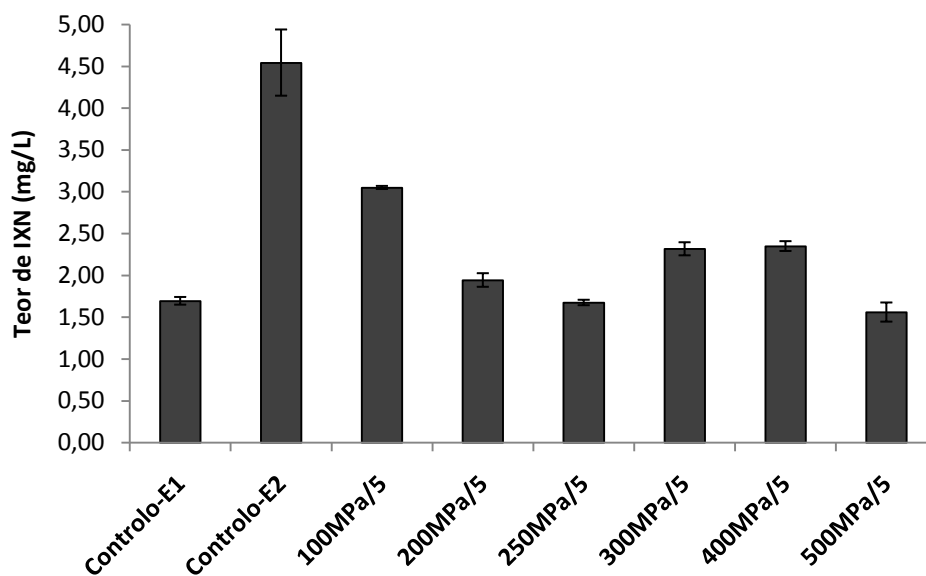


Gráfico 7- Representação do teor de IXN (mg/L) presente nas amostras de mosto pressurizadas a 100, 200, 250, 300, 400 e 500 MPa durante 5 minutos e controlos

Parte III. Resultados e Discussão

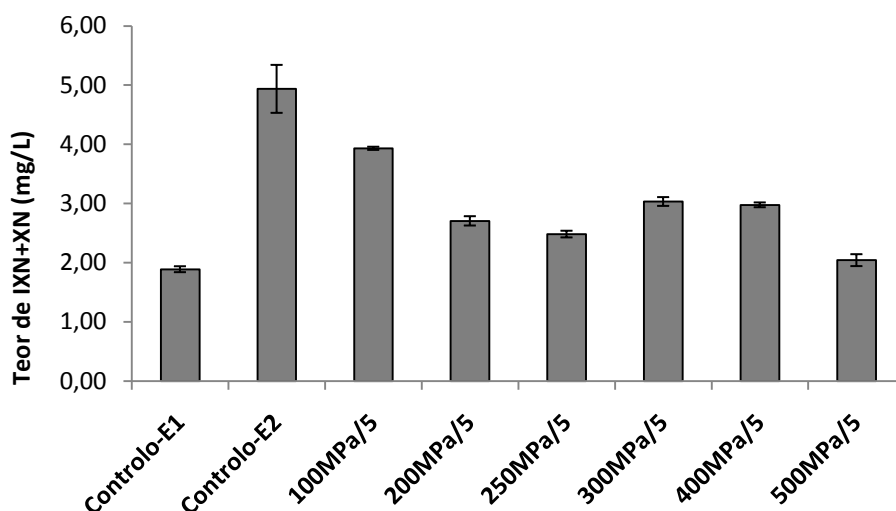


Gráfico 8- Representação do teor de XN+IXN (mg/L) presente nas amostras de mosto pressurizadas a 100, 200, 250, 300, 400 e 500 MPa durante 5 minutos e controlos

Observando o Gráfico 6, verifica-se que todas as amostras de mosto pressurizados continuam a apresentar um teor de XN mais elevado que as amostras controlo, chegando a apresentar um teor de XN de pelo menos 2,5 vezes mais elevado que no controlo – E1. Além disso, é de notar que ao aumentar a pressão obtêm-se um comportamento em pirâmide, havendo um pico máximo de teor de XN a 250 MPa, sendo este teor 4 vezes mais elevado que no controlo-E1. Relativamente ao controlo-E2, observa-se que para 200 MPa e 300 MPa o valor de XN chega quase a ser 2 vezes superior, sendo que para 250 MPa o teor de XN chega mesmo a ser mais que o dobro que o controlo-E2. No Gráfico 7, pode-se observar que tirando as amostras de controlo e o 500 MPa/5min, o IXN mostra o mesmo comportamento observado anteriormente, ou seja, quanto menor é o teor de IXN, maior é o teor de XN no mosto. O IXN apresenta um comportamento oposto ao do XN, expondo um pico mínimo de teor de IXN a 250 MPa, tendo o pico máximo de IXN nas amostras pressurizadas a 100MPa. As amostras pressurizadas continuam a apresentar todas um teor de IXN maior que o controlo-E1, mostrando que na gama de pressão estudada ocorre isomerização do XN, no entanto a um nível muito inferior ao que ocorre no controlo-E2.

Observando os gráficos acima observa-se que tanto para 100 MPa como para 500 MPa há uma menor quantidade de XN no mosto em relação às outras amostras pressurizadas, sendo por motivos diferentes. Para 100 MPa obteve-se, dentro das amostras pressurizadas, um valor de XN+IXN bastante elevado, concluindo-se que foi nessa gama tempo/pressão que se extraiu mais XN, mas que ao mesmo tempo ocorreu maior isomerização, ficando o teor de XN no final mais baixo que nas outras amostras. Em relação à amostra pressurizada a 500 MPa observa-se que o baixo teor de XN presente nessa amostra pode ser devido a fraca extracção do XN nessa pressão,

visto não apresentar aumento de IXN nessa pressão, ou então, ocorreu alguma degradação do XN e IXN devido ao forte processamento.

1.3.3 Pressurização de mosto “lager” com uma adição de *pellets* três vezes mais elevada

Através dos resultados anteriores conclui-se que com AP se consegue extrair XN dos *pellets* para o mosto, sendo que em algumas pressões ocorre para além da extracção, a isomerização do XN. Com base nessa observação decidiu-se realizar um ensaio em que se adicionou três vezes mais *pellets* ao mosto antes da pressurização (amostras “3xpellets”), de modo a tentar obter uma concentração mais elevada de XN no mosto. As amostras foram pressurizadas a 200, 250 e 300 MPa durante 5 minutos, visto que foi com essas pressões e o tempo de pressurização que se obteve valores mais elevados de XN no mosto. Foi efectuado um controlo (3xp-controlo-E2) com uma lupulagem, aos 85 minutos de ebulição, com três vezes mais de *pellets* do que efectuada no controlo-E2. O controlo-E1 foi mantido como ensaio padrão de comparação para as amostras pressurizadas.

As dosagens de cada lupulagem efectuada nas amostras “3xpellets”, bem como as respectivas concentrações de ácidos alfa (considerando os valores indicado pelo fornecedor dos *pellets*) e XN (considerando os valores de XN determinados, anteriormente, nos *pellets*) encontram se resumidos na tabela seguinte. As concentrações de XN indicados na tabela seriam os valores esperados nas amostras de mosto, no caso de uma extracção completa e sem isomerização do XN.

Tabela 16- Dosagem dos *pellets* nos ensaios “3xpellets” realizados, bem como as respectivas concentrações de ácidos alfa e XN

Amostras de mosto “lager” 3xp	Dosagem (g/L)	Ácidos-alfa (mg/L)	XN (mg/L)
Controlo - E1	2,4 ^a	96	8,8
Controlo - E2	2,4 ^a	96	8,8
	7,2 ^b	288	26,4
	Total 9,6	384	35,2
Amostras -P	2,4 ^a	96	8,8
	7,2 ^c	288	26,4
	Total 9,6	384	35,2

^a Adição dos *pellets* 15 minutos depois do início da ebulição; ^b Adição dos *pellets* aos 85 minutos de ebulição; ^c Adição dos *pellets* antes da pressurização.

Parte III. Resultados e Discussão

Na tabela 17 encontram-se resumidos o teor de XN, IXN e XN+IXN presentes nas amostras de mosto tratado, bem como os desvios padrões e os coeficientes de variação (n=2).

Tabela 17- Valores do teor de XN, IXN e a soma deles presentes nas amostras “3xpellets” controle e pressurizadas, bem como os correspondentes desvios padrões e coeficientes de variação

Amostras de mosto “lager”		Teor de XN (mg/L)	Teor de IXN (mg/L)	Teor de XN+IXN (mg/L)
(Desvio padrão/Coefficiente de variação (%))				
Controlos	E1	0,195 (0,004/2,1)	1,694 (0,046/2,7)	1,889 (0,050/2,6)
	3xp-E2	0,932 (0,004/0,4)	13,790 (0,294/2,1)	14,721 (0,290/2,0)
Amostras –P “3xpellets”	200MPa 5min	1,136 (0,028/2,5)	1,631 (0,044/2,7)	2,768 (0,072 /2,6)
	250MPa 5min	0,996 (0,011/1,1)	1,569 (0,059/3,8)	2,566 (0,070/2,7)
	300MPa 5min	1,107 (0,011/1,0)	1,794 (0,025/1,4)	2,901 (0,014/0,5)

Os gráficos 9, 10 e 11 apresentam os valores do teor de XN, IXN e a soma deles, respectivamente, nas amostras “3xpellets” controlos e pressurizadas.

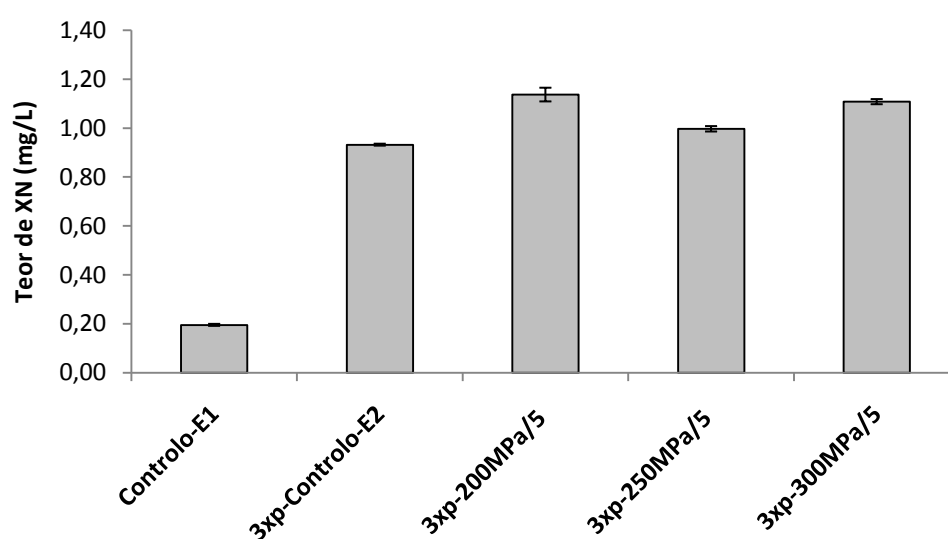


Gráfico 9- Representação do teor de XN (mg/L) presente nas amostras de “3xpellets” pressurizadas e controlos

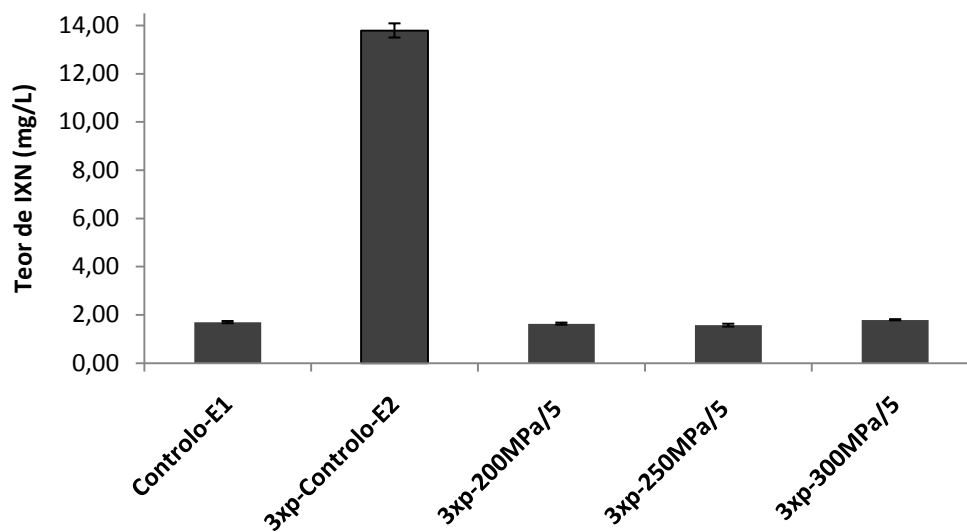


Gráfico 10- Representação do teor de IXN (mg/L) presente nas amostras “3xpellets” pressurizadas e controlos

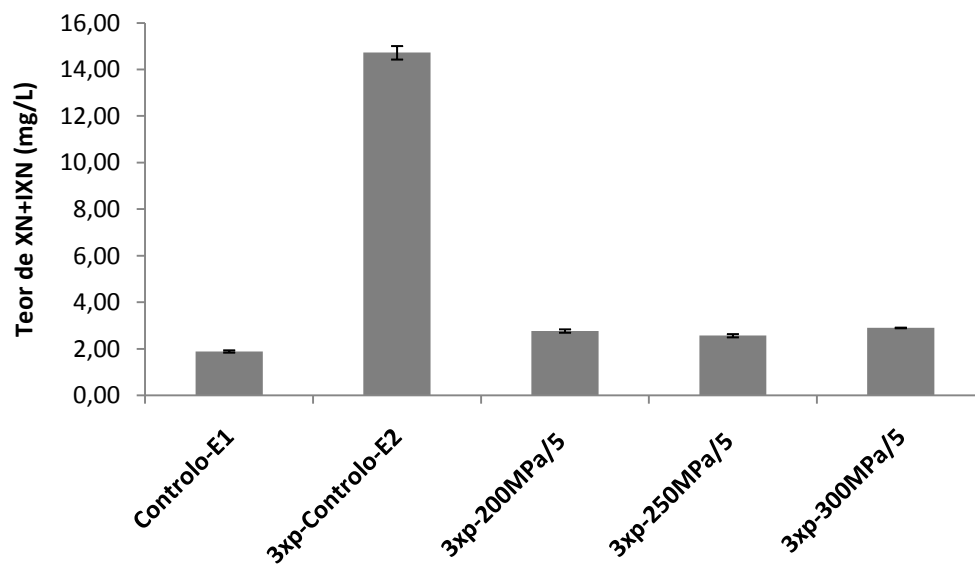


Gráfico 11- Representação do teor de XN+IXN (mg/L) presente nas amostras “3xpellets” pressurizadas e controlos

Parte III. Resultados e Discussão

Observando o Gráfico 9, verifica-se que apesar de o teor de XN nas amostras pressurizadas ter aumentado, comparativamente aos ensaios anteriores, os valores de XN para as amostras de mosto “*3xpellets*” pressurizadas não diferem muito do 3xp-controlo-E2. Isto é, comparativamente as amostras-P/5min em que se obteve para as pressões 200, 250 e 300MPa duas vezes mais teor de XN que o respectivo controlo-E2, neste ensaio todas as amostras pressurizadas apresentam um teor de XN de pelo menos 5 vezes mais elevado que no controlo-E1 e praticamente o mesmo teor que o 3xp-controlo-E2. Sendo assim, analisando apenas o Gráfico 9, poder-se-ia afirmar que se extraiu a mesma quantidade de XN nas amostras pressurizadas e no 3xp-controlo-E2. No entanto, tal afirmação é incorrecta, visto que ao analisar o Gráfico 11 verifica-se que o 3xp-controlo-E2 tem um valor total de prenilflavonóides (XN+IXN) muito superior às restantes amostras, concluindo-se que se extraiu mais XN para o mosto no controlo, mas que grande parte desse isomerizou para IXN nos 5 minutos finais de ebulição do mosto.

Era de esperar um aumento muito mais significativo do teor de XN nas amostras “*3xpellets*” pressurizadas relativamente às amostras-P/5min visto se ter adicionado três vezes mais *pellets* na segunda lupulagem neste ensaio. Comparando os dois ensaios observa-se que para 250MPa passa-se de um teor de XN de 0,808 mg/L (amostra 250 MPa/5min) para apenas 0,996 mg/L (3xp-250 MPa/5min) quando é adicionando três vezes mais *pellets* na segunda lupulagem. Esse pequeno incremento de concentração de XN pode ser devido a que neste ensaio se esteja próximo do limite de solubilidade do XN no mosto “lager” utilizado.

Observando o Gráfico 10, verifica-se que não há diferenças entre o teor de IXN das amostras pressurizadas neste ensaio e o controlo-E1, indicando que não ocorreu isomerização do XN naquelas gamas de pressão/tempo. Este resultado vem ao encontro dos resultados obtidos no ensaio anterior em que se verificou que a 200, 250 e 300MPa praticamente não ocorre isomerização do XN, mas apenas a sua extracção.

Pode-se averiguar com estes resultados que o tratamento por AP neste ensaio não mostrou benefícios em relação à ebulição, no que consta ao teor final de XN no mosto depois de duas lupulagens. Analisando o teor total de IXN+XN presente nas amostras pressurizadas (Tabela 17) em relação ao teor de XN proveniente dos *pellets* adicionados nas lupulagens (Tabela 16), verifica-se que neste ensaio só se obteve nas amostras 7,9% dos prenilflavonóides (XN+IXN) adicionados, demonstrando que ainda fica uma grande quantidade de XN nos *pellets*.

1.3.4 Pressurização de mosto “preto”

Como já foi referido anteriormente, tem sido relatado na literatura que as cervejas quando elaboradas com mosto torrado (preto), contêm maior teor de XN. Sendo assim, foi elaborado um ensaio envolvendo a utilização de mosto torrado de modo a combinar o efeito da AP na extracção de XN com o carácter inibitório do mosto preto na isomerização do XN em IXN.

Visto que, os ensaios que envolveram a adição de três vezes mais *pellets* na segunda lupulagem não se revelaram muito promissores ao contrário dos primeiros ensaios realizados, decidiu-se realizar lupulagens idênticas às realizadas nos ensaios para optimização da gama tempo/pressão. Foram realizadas portanto duas lupulagens para as amostras pressurizadas e controlo-E2 e apenas uma lupulagem para o controlo-E1 (Tabela 13). Todas as amostras realizadas neste ensaio são chamadas “preto” de modo a facilitar a identificação delas. As amostras foram pressurizadas a 200, 250 e 300MPa durante 5 minutos, visto que foi com essas pressões e o tempo de pressurização que se obteve valores mais elevados de XN no mosto “lager”.

Na Tabela 18 encontram-se resumidos o teor de XN, IXN e XN+IXN presentes nas amostras de mosto “preto” tratado, bem como os desvios padrões e os coeficientes de variação (n=2).

Tabela 18- Valores do teor de XN, IXN e XN+IXN presentes nas amostras de mosto “preto” controlo e pressurizadas, bem como os correspondentes desvios padrões e coeficientes de variação

Amostras de mosto “preto”		Teor de XN (mg/L)	Teor de IXN (mg/L)	Teor de XN+ IXN (mg/L)
(Desvio padrão/Coefficiente de variação (%))				
Controlos	E1	0,779 (0,008/1,1)	2,090 (0,065/3,1)	2,869 (0,056/2,0)
	E2	1,428 (0,043/3,0)	3,111 (0,064/2,1)	4,539 (0,021/0,5)
Amostras –P	200MPa 5min	1,528 (0,051/3,3)	1,957 (0,060/3,1)	3,485 (0,009/0,3)
	250MPa 5min	1,582 (0,035/2,2)	2,029 (0,024/1,2)	3,610 (0,011/0,3)
	300MPa 5min	1,366 (0,006/0,5)	2,001 (0,028/1,4)	3,367 (0,021/0,6)

Parte III. Resultados e Discussão

Os gráficos 12, 13 e 14 apresentam os valores do teor de XN, IXN e XN+IXN, respectivamente, nas amostras de mosto “preto” controles e pressurizadas.

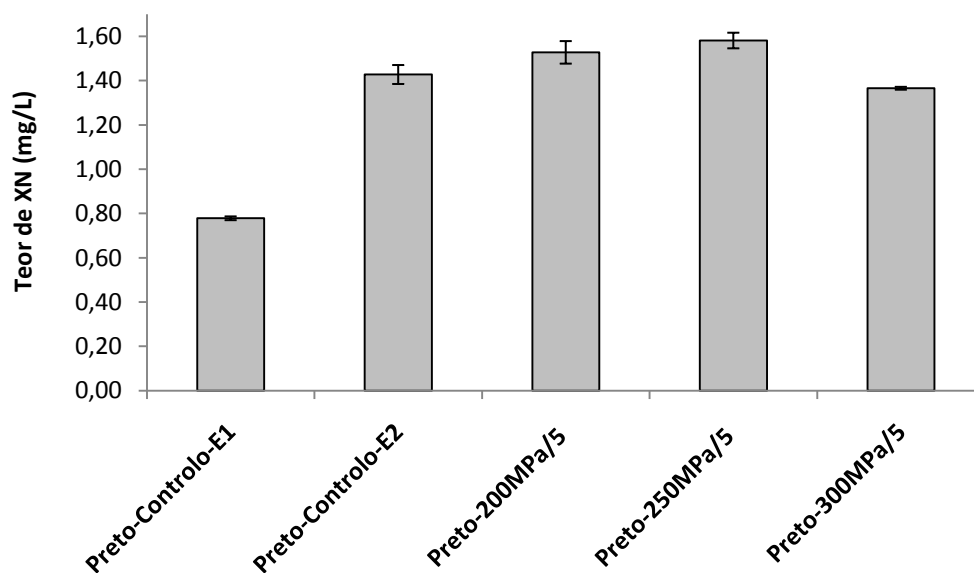


Gráfico 12- Representação do teor de XN (mg/L) presente nas amostras de mosto “preto” pressurizadas e controlos

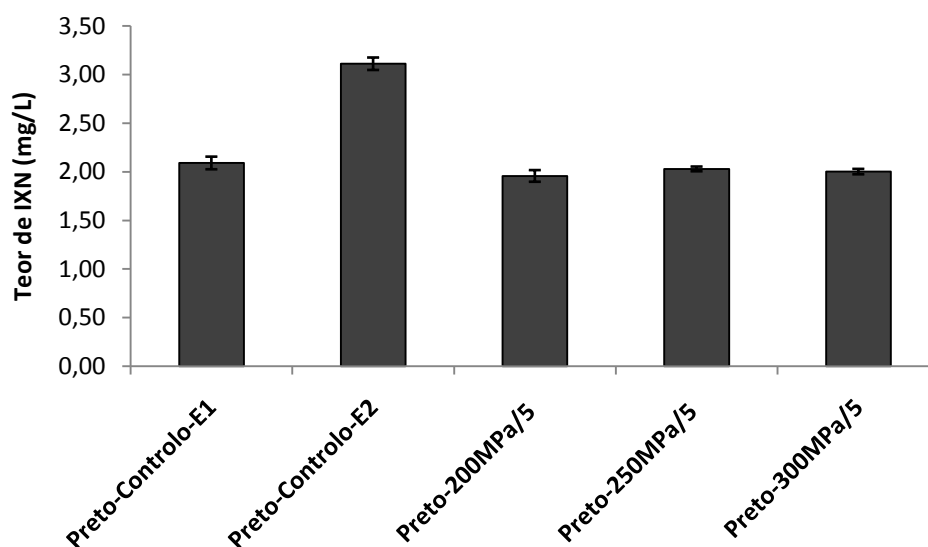


Gráfico 13- Representação do teor de IXN (mg/L) presente nas amostras de mosto “preto” pressurizadas e controlos

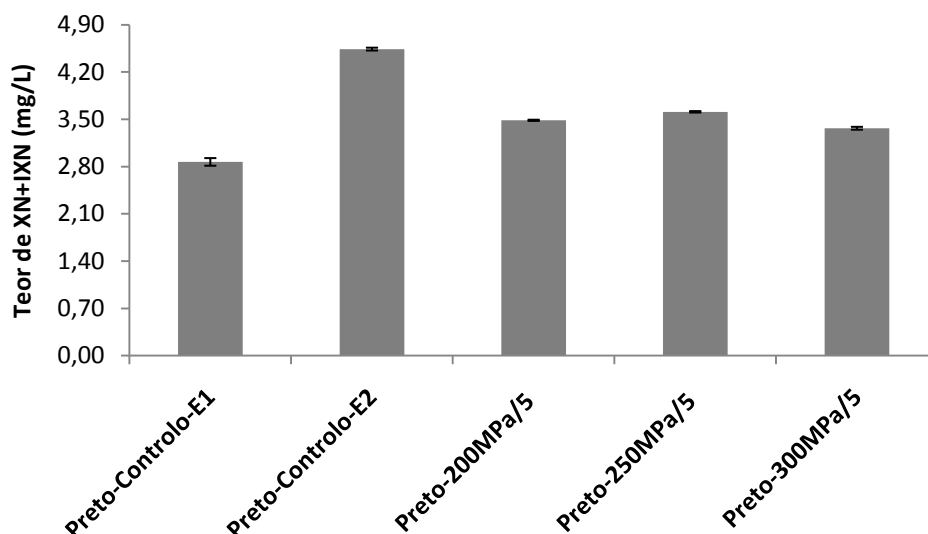


Gráfico 14 - Representação do teor de XN+IXN (mg/L) presente nas amostras de mosto “preto” pressurizadas e controlos

Observando o Gráfico 12, verifica-se que se obteve um comportamento semelhante ao ensaio “*3xpellets*”, pois os valores de XN para as amostras de mosto “preto” pressurizadas não diferem muito do respectivo controlo-E2. No entanto, é de notar que se obteve com mosto “preto” teores de XN mais altos relativamente aos outros ensaios realizados, tendo-se conseguido obter teores de XN a volta de 1,5 mg/L para as amostras pressurizadas. Ao comparar estes valores com os ensaios anteriores, verifica-se que se conseguiu com duas lupulagens de *pellets* obter um teor de XN 2 vezes superior usando mosto torrado relativamente a mosto “lager” (amostras-P) e 1,4 vezes superior relativamente a mosto “lager” com a segunda lupulagem com três vezes mais *pellets* (amostras-P “*3xpellets*”).

Em comparação com o malte “lager”, os maltes escuros (por exemplo, torrado e caramelo) são submetidos a temperaturas mais altas durante a brassagem, levando a reacções de acastanhamento não enzimático (Maillard) mais intensas. A reacção de Maillard é um factor-chave na qualidade do malte, sendo que, não só envolve a formação de cores, mas também a formação de antioxidantes [45]. Os antioxidantes ao bloquearem a formação de radicais livres como o anião radical superóxido e radicais hidroxilos interferem com reacções de isomerização e de degradação. Esta hipótese juntamente com o aumento da solubilidade do XN em mosto torrado [44, 45] pode justificar a presença de um teor de XN mais elevado no mosto “preto” do que no “lager”.

Parte III. Resultados e Discussão

Relativamente ao teor de IXN presente nas amostras observa-se outra vez a ausência de isomerização nas amostras pressurizadas a 200, 250 e 300MPa durante 5 minutos (Gráfico 13), visto que não há diferenças significativas entre o teor de IXN das amostras pressurizadas neste ensaio e o “preto”-controlo-E1. Comparando os valores de IXN obtidos nas amostras pressurizadas de mosto “preto” relativamente às amostras de mosto “lager” com idêntica lupulagem e processamento, observa-se que não há diferenças no teor de IXN para estes ensaios.

Ao observar o Gráfico 14 verifica-se que o “preto”-controlo E2 apresenta o teor de XN+IXN mais elevado, o que vem ao encontro dos resultados obtidos nos ensaios anteriores em que se obtêm maior teor total dos prenilflavonóides estudados quando a segunda lupulagem é realizada ainda na etapa de ebulição e não antes da pressurização.

Apesar de se ter obtido neste ensaio os teores mais altos de XN, só foi obtido nas amostras pressurizadas 20,5% de XN+IXN do XN proveniente dos *pellets* adicionados na lupulagem, sendo este valor, mesmo assim, mais elevado que nos ensaios anteriores.

1.4 Resultados físico-químicos de amostras de mosto

Visto ter-se conseguido aumentar o teor de XN no mosto com aplicação de AP, foram analisados alguns parâmetros físico-químicos de qualidade do mosto (amargor, pH, cor e extracto primitivo), de modo a verificar se com AP consegue-se obter um mosto viável a nível comercial e ao mesmo tempo com alto teor de XN.

Foram escolhidas para análise as amostras controlos do ensaio da optimização da gama tempo/pressão, do ensaio “3*xpellets*”e do ensaio com mosto “preto”. Além das amostras controlos foram analisadas as amostras pressurizadas a 250 MPa durante 5 e 15 minutos do ensaio da optimização da gama tempo/pressão e as amostras pressurizadas a 200 MPa durante 5 minutos dos ensaios “3*xpellets*”e mosto “preto”. A escolha destas amostras teve como objectivo analisar as amostras com maior quantidade teor de XN de cada ensaio e compará-las às respectivas amostras controlos, de modo a analisar o efeito da pressão e do tempo de pressurização na qualidade físico-química do mosto.

Foram fornecidos pela Unicer Bebidas de Portugal S.A parâmetros físico-químicos de três amostras de mosto “lager” (controlos L1,L2 e L3) e uma de mosto “preto” (controlo-B1) utilizados por esta empresa cervejeira para produção de cervejas comerciais. Estas quatro amostras foram retiradas das caldeiras de ebulição no fim do processo de ebulição, tendo sido usado na lupulagem dos mostos, extracto ao CO₂ supercrítico em vez de *pellets* tipo 45. Estas amostras servem para comparar as amostras de mosto tratados neste trabalho experimental com o que é produzido na indústria cervejeira.

Nas tabelas 19 e 20 apresentam, respectivamente, os parâmetros físico-químicos medidos nas amostras de mosto “lager” e “preto” acima mencionadas.

Tabela 19- Valores de pH, cor, amargor e extracto das amostras de mosto “lager” analisadas

Amostras de mosto “lager”		pH	Cor (EBC)	Amargor (UA)	Extracto primitivo (°P)
Controlo	L1	5,0-5,4	9,5-12,5	23-29	14,20-14,80
	L2	4,9-5,3	12-15	29-35	14,70-15,50
	L3	4,2-4,6	15-18	48-54	12,40-13
	E1	5,15	13,4	30,6	15,35
	E2	5,18	17,1	42,8	15,39
	3xP-E2	5,27	18,7	65,3	15,2
Amostras-P	250MPa/5	5,21	13,4	47,0	15,43
	250MPa/15	5,20	12,9	47,0	15,45
	3xP-200MPa/5	5,20	15,2	60,0	15,03

Tabela 20- Valores de pH, cor, amargor e extracto primitivo das amostras de mosto “preto” analisadas

Amostras de mosto “preto”		pH	Cor (EBC)	Amargor (UA)	Extracto primitivo (°P)
Controlo	B1	5,0-5,4	210-250	21-27	14,60
	E1	5,12	62,3	21,0	13,18
	E2	5,23	60,4	31,0	12,77
Amostra-P	200MPa/5	5,11	58,1	31,0	12,79

Parte III. Resultados e Discussão

Observando as tabelas 19 e 20, verifica-se que tanto para as amostras pressurizadas de mosto “lager” como para as amostras de mosto “preto” não há variações relevantes a nível do pH, cor e extracto relativamente aos respectivos controlos E1. Isto indica que os tratamentos de pressão efectuados não influenciaram o pH, a cor e o extracto primitivo do mosto. Estes resultados vão ao encontro dos resultados encontrados na literatura, visto que, como referido anteriormente na revisão bibliográfica, Fischer *et al.* 1998 [65] e Pérez-Lamela *et al.* 2004 [66] não observaram alterações no pH com o processamento de mosto lupulado até 600 MPa e Buzrul *et al.* 2005 [3, 67] verificaram que parâmetros físico-químicos da cerveja, como o teor de etanol, o extracto, a cor e o pH não são afectados por tratamento de AP entre 200 a 350MPa durante 5 minutos. Outro facto relevante é o de não se observar diferenças relevantes entre as amostras-P 250/5min e 250/15min, indicando que os tempos de pressurização estudados não influenciam os parâmetros físico-químicos do mosto. Nas amostras controlos E2 e 3xP-E2 de mosto “lager” observa-se um ligeiro aumento da cor relativamente ao controlo E1 do mesmo mosto.

Comparando os valores obtidos de pH, cor e extracto das amostras de mosto “lager” pressurizadas com as amostras controlos fornecidos pela Unicer (Tabela 19) pode-se observar que os valores obtidos estão nas gamas dos parâmetros físico-químicos dos mostos produzidos pela empresa. O pH das amostras “lager” pressurizadas estão dentro da gama dos controlos L1 e L2, enquanto que a cor e o extracto estão na gama do controlo-L2. Relativamente à amostra de mosto “preto” pressurizada (Tabela 20) apenas o pH da amostra se encontra na gama do controlo-B1, sendo que tanto o extracto como cor (especialmente este), apresentam valores abaixo do controlo-B1.

Observando os valores de amargor nas tabelas 19 e 20, verifica-se um comportamento diferente relativamente aos outros parâmetros físico-químicos. Isto é, verifica-se que tanto as amostras de mosto “lager” como as de mosto “preto” pressurizadas apresentam valores de amargor mais elevados que os controlos E1 e próximos dos respectivos controlos E2. No entanto, excluindo a amostra 3xp-200MPa/5 que apresenta um valor de amargor que ultrapassa as gamas dos controlos L1, L2 e L3, as amostras-P 250/5min e 250/15min apresentam valores de amargor muito próximos do controlo-L3 e a amostra de mosto preto pressurizado apresenta um valor de amargor muito próximo da gama do controlo-B1.

De modo a poder-se verificar, se o aumento do amargor nas amostras pressurizadas é devido a isomerização dos ácidos alfa a ácidos iso-alfa com o tratamento da AP, ou apenas devido a uma maior extracção de compostos amargos dos *pellets* para o mosto (por exemplo: óleos essenciais e os próprios ácidos alfa), analisaram-se os parâmetros físico-químicos de três amostras de mosto “lager” e mosto “preto”. Foi analisado para cada mosto uma amostra de mosto antes de qualquer tratamento e lupulagem (amostras *inicial*), uma amostra de mosto sem o tratamento de ebulição,

mas com uma lupulagem e pressurização, 200MPa durante 5 minutos para o mosto “preto” e 250MPa durante 5 minutos para o mosto “lager” (amostras *press*), e por fim uma amostra de mosto com duas lupulagens (uma aos 15 minutos e uma aos 85 minutos) em mosto sem ebulição, mas apenas em agitação à temperatura ambiente durante 90 minutos (amostras *contact*).

A Tabela 21 apresenta, respectivamente, os parâmetros físico-químicos medidos nas amostras de mosto “lager” e “preto” acima mencionados.

Tabela 21- Valores de pH, cor, amargor e extracto das amostras *inicial*, *press* e *contact* analisadas

Amostras		pH	Cor (EBC)	Amargor (UA)	Extracto primitivo (°P)
“Lager”	<i>Inicial</i>	5,26	8,8	1,7	15,07
	<i>Press</i>	5,26	10	15,3	15,15
	<i>Contact</i>	5,25	9,8	24,3	15,36
“Preto”	<i>Inicial</i>	5,36	62,7	12,4	13,36
	<i>Press</i>	5,35	61,3	27,1	13,24
	<i>Contact</i>	5,37	61,1	32,5	12,94

Observando a Tabela 21, verifica-se que existe um aumento de amargor nas amostras *press* e *contact* em relação as amostras *inicial*. Estes resultados vêm demonstrar que não há isomerização dos ácidos alfa para ácidos iso-alfa com a AP, mas apenas extracção e solubilização de compostos amargos dos *pellets* para o mosto quando esses entram em contacto, visto que, nas amostras *contact* não se efectuou nenhum tratamento com pressão nem temperatura e o amargor aumentou (para mosto “lager” o amargor aumentou 14 vezes com duas lupulagens à temperatura ambiente). Como já foi referido a AP aumenta o processo de extracção de compostos naturais, sendo nesse caso extraído compostos amargos do lúpulo, aumentando assim o amargor no mosto. Estes resultados vão ao encontro dos resultados encontrados na literatura, visto que, como referido anteriormente na revisão bibliográfica, processamento até 600MPa não isomerizam os ácidos alfa [65, 66]. É de notar que neste ensaio, ao contrário do amargor, não se observa alterações relevantes a nível de pH, cor e extracto.

2. Estudo da cinética de isomerização térmica do XN

Depois de se ter conseguido extrair quantidades XN dos *pellets* para o mosto usando tratamentos de AP a 25 °C, foi realizado o estudo da cinética de isomerização térmica do XN com vista a possível utilização combinada de pressão com temperatura para extrair maiores quantidades de XN dos *pellets* para o mosto. Sendo assim, de modo a estudar apenas o efeito da temperatura na isomerização do XN a IXN, este estudo foi realizado num sistema modelo com 10% de sacarose e pH 5.5, simulando quantidade de açúcar e o pH do mosto. Assim é eliminado a perda de XN como resultado da adsorção deste às proteínas e ao lúpulo durante a ebulição.

Primeiramente foi estudado o comportamento do XN a 100 °C, 90 °C e 80 °C, sendo medido ao longo do tempo o teor de XN e IXN.

2.1 Isomerização térmica do XN a 100°C

Para este ensaio foi analisado o teor de XN e IXN na solução modelo depois de 15, 30 e 60 minutos a 100 °C.

Na Tabela 22 encontra-se resumido os teores de XN, IXN e XN+IXN presentes ao longo do tempo na solução modelo a 100 °C, bem como os correspondentes desvios padrões e coeficientes de variação (n=2). O Gráfico 15 apresentada valores do teor de XN, IXN e XN+IXN nas amostras de solução modelo a 100 °C.

Tabela 22-Valores do teor de XN, IXN e XN+IXN presentes ao longo do tempo na solução modelo a 100 °C, bem como os correspondentes desvios padrões e coeficientes de variação

Temperatura = 100°C			
Tempo (min)	Teor de XN (mg/L)	Teor de IXN (mg/L)	Teor de XN+IXN (mg/L)
(Desvio padrão/Coefficiente de variação (%))			
0	19,887 (0,326/1,6)	< L.D.	19,887 (0,326/1,6)
15	14,361 (0,406/2,8)	5,644 (0,052/0,9)	20,042 (0,354/1,8)
30	9,493 (0,099/1,0)	10,037 (0,437/4,4)	19,530 (0,337/1,7)
60	6,661 (0,298/4,5)	10,953 (0,254/2,3)	17,614 (0,552/3,1)

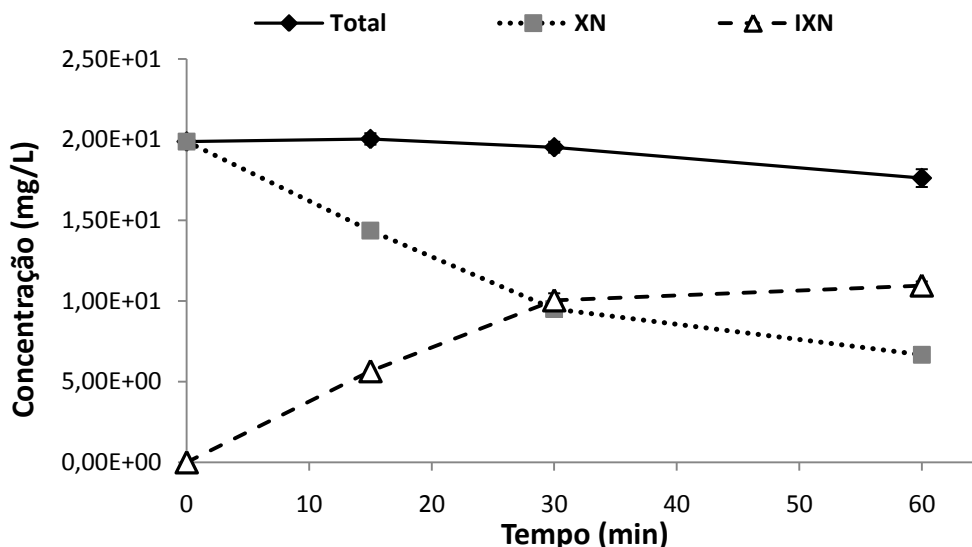


Gráfico 15- Representação dos valores do teor de XN, IXN e XN+IXN nas amostras de solução modelo a 100°C em função do tempo

Analisando o Gráfico 15, observa-se que a isomerização do XN a 100 °C tende a seguir uma cinética de 1º ordem, sendo que, nos primeiros minutos a isomerização do XN é mais rápido (nos 15 minutos iniciais é isomerizado 5,644 mg/L de XN), mas que ao passar do tempo tende a estabilizar (dos 30 aos 60 minutos são isomerizados apenas 0,916 mg/L). Esse comportamento é visível tanto na diminuição do teor de XN como no aumento do teor de IXN ao longo do tempo.

Observando o teor de XN+IXN ao longo do tempo, verifica-se que o teor tende a decrescer, havendo uma redução de 11,4% do total de XN+IXN aos 60 minutos a 100 °C, relativamente ao teor inicial. Esse comportamento indica que a 100 °C além de ocorrer isomerização do XN, ocorre também a degradação deste ao longo do tempo a essa temperatura, podendo-se aferir que na produção de cerveja ocorre alguma degradação do XN durante a etapa da ebulição do mosto.

2.2 Isomerização do XN a 90°C

Para este ensaio foi analisado o teor de XN e IXN na solução modelo a 90 °C depois de 30, 60, 90 e 105 minutos aquela temperatura.

Na tabela 23 encontra-se resumido os teores de XN, IXN e XN+IXN presentes ao longo do tempo na solução modelo a 90 °C, bem como os correspondentes desvios padrões e coeficientes de variação (n=2). O Gráfico 16 apresentada valores do teor de XN, IXN e XN+IXN nas amostras de solução modelo a 90 °C.

Parte III. Resultados e Discussão

Tabela 23- Valores do teor de XN, IXN e XN+IXN presentes ao longo do tempo na solução modelo a 90 °C, bem como os correspondentes desvios padrões e coeficientes de variação

Temperatura = 90 °C			
Tempo (min)	Teor de XN (mg/L)	Teor de IXN (mg/L)	Teor de XN+IXN (mg/L)
(Desvio padrão/Coefficiente de variação (%))			
0	20,001 (0,098/0,5)	< L.D.	20,001 (0,098/0,5)
30	14,901 (0,406/2,7)	4,640 (0,087/1,9)	19,603 (0,318/1,6)
60	10,259 (0,175/1,7)	7,706 (0,105/1,4)	17,965 (0,280/1,6)
90	7,769 (0,207/2,7)	11,291 (0,595/5,3)	19,060 (0,388/2,0)
105	7,157 (0,174/2,4)	11,888 (0,136/1,1)	19,044 (0,038/0,2)

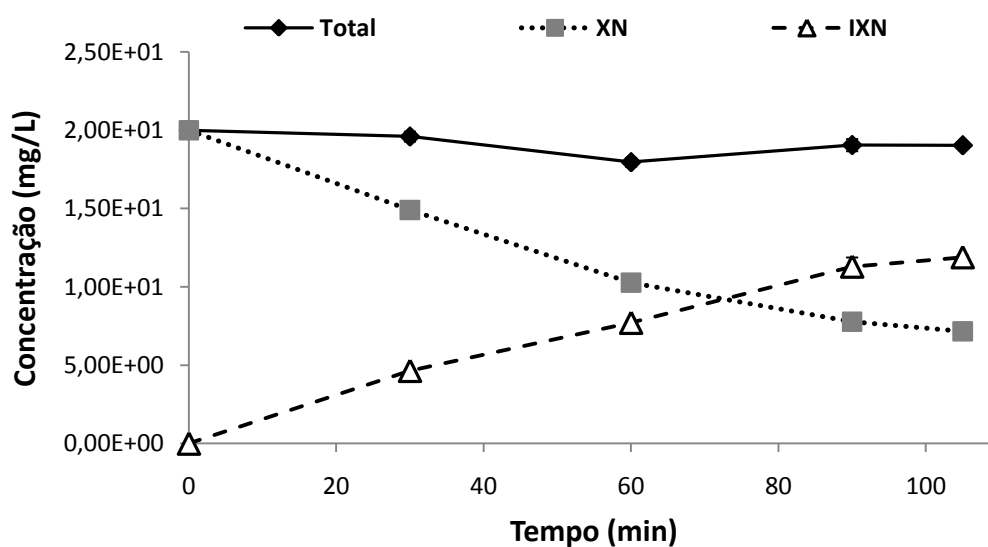


Gráfico 16- Representação dos valores do teor de XN, IXN e XN+IXN nas amostras de solução modelo a 90 °C em função do tempo

Analisando o Gráfico 16, observa-se que a isomerização do XN a 90 °C tende, como no ensaio anterior, a seguir uma cinética de 1º ordem. Verifica-se que a isomerização do XN tende a

estabilizar ao longo do tempo, sendo a isomerização mais rápida na etapa inicial. Comparando com o ensaio a 100 °C é de notar que a isomerização do XN a 90 °C é mais lenta, visto que ao fim de 105 minutos ainda se mantinha na solução modelo 7,157 mg/L de XN enquanto que a 100 °C ao fim de 60 minutos apenas se encontrava na solução 6,661 mg/L. Verifica-se também que houve uma menor perda do teor total de XN+IXN ao longo do tempo, tendo o teor total de XN+IXN inicial diminuído apenas 4,8% em 105 minutos. Com este resultado pode-se concluir que a 90 °C o XN isomeriza mais lentamente, além de se degradar menos, comparativamente a 100 °C.

2.3 Isomerização do XN a 80°C

Para este ensaio foi analisado o teor de XN e IXN na solução modelo depois de 45, 90, 135, 180 minutos a 80 °C.

Na Tabela 24 encontra-se resumido os teores de XN, IXN e XN+IXN presentes ao longo do tempo na solução modelo a 80 °C, bem como os correspondentes desvios padrões e coeficientes de variação (n=2). O Gráfico 17 apresenta valores do teor de XN, IXN e XN+IXN nas amostras de solução modelo a 80 °C.

Tabela 24- Valores do teor de XN, IXN e XN+IXN presentes ao longo do tempo na solução modelo a 80 °C, bem como os correspondentes desvios padrões e coeficientes de variação

Temperatura = 80 °C			
Tempo (min)	Teor de XN (mg/L)	Teor de IXN (mg/L)	Teor de XN+IXN (mg/L)
(Desvio padrão/Coefficiente de variação (%))			
0	19,744 (0,427/2,2)	< L.D.	19,744 (0,427/2,2)
45	17,789 (0,463/2,6)	1,683 (0,041/2,4)	19,502 (0,504/2,6)
90	15,854 (0,416/2,6)	4,052 (0,133/3,3)	19,906 (0,549/2,8)
135	11,652 (0,148/1,3)	8,384 (0,446/5,3)	20,036 (0,594/3,0)
180	9,281 (0,285/3,1)	10,211 (0,082/0,8)	19,492 (0,285/1,5)

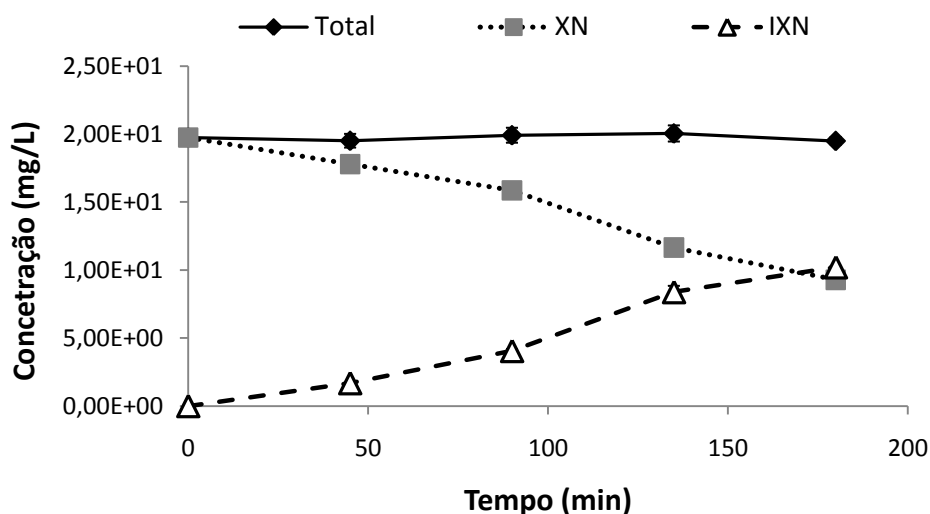


Gráfico 17 - Representação dos valores do teor de XN, IXN e XN+IXN nas amostras de solução modelo a 80 °C em função do tempo

Analisando o Gráfico 17, observa-se que a 80 °C a isomerização do XN ao longo do tempo também tende a seguir uma cinética de 1ª ordem. Verifica-se que a isomerização do XN a 80 °C é ainda mais lenta que a 90 °C, indicando que a isomerização do XN diminui com a diminuição da temperatura. Observando o teor total de XN+IXN ao longo do tempo verifica-se que não há diferenças significativas entre o teor inicial e o final, concluindo-se que a 80 °C não ocorre degradação do XN ao longo do tempo, mas apenas a sua isomerização.

2.4 Constantes cinéticas de isomerização do XN a 100 °C, 90 °C e 80 °C

Como se verificou que a isomerização do XN a IXN seguia uma cinética de 1ª ordem calculou-se as constantes cinéticas (k), o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) e o tempo de redução decimal (D) do XN para cada temperatura.

Na Tabela 25 encontra-se resumido os valores de $\ln(x/x_0)$ para cada tempo a 100 °C, 90 °C, 80 °C. O Gráfico 18 apresenta valores de $\ln(x/x_0)$ em função do tempo para cada temperatura estudada.

Tabela 25- Valores de $\ln(x/x_0)$ e respectivo tempo para 100 °C, 90 °C e 80 °C

Temperatura					
100 °C		90 °C		80 °C	
Tempo (min)	$\ln(x/x_0)$	Tempo (min)	$\ln(x/x_0)$	Tempo (min)	$\ln(x/x_0)$
0	0	0	0	0	0
15	-0,326	30	-0,294	45	-0,104
30	-0,739	60	-0,668	90	-0,219
60	-1,094	90	-0,946	135	-0,527
--	--	105	-1,028	180	-0,755

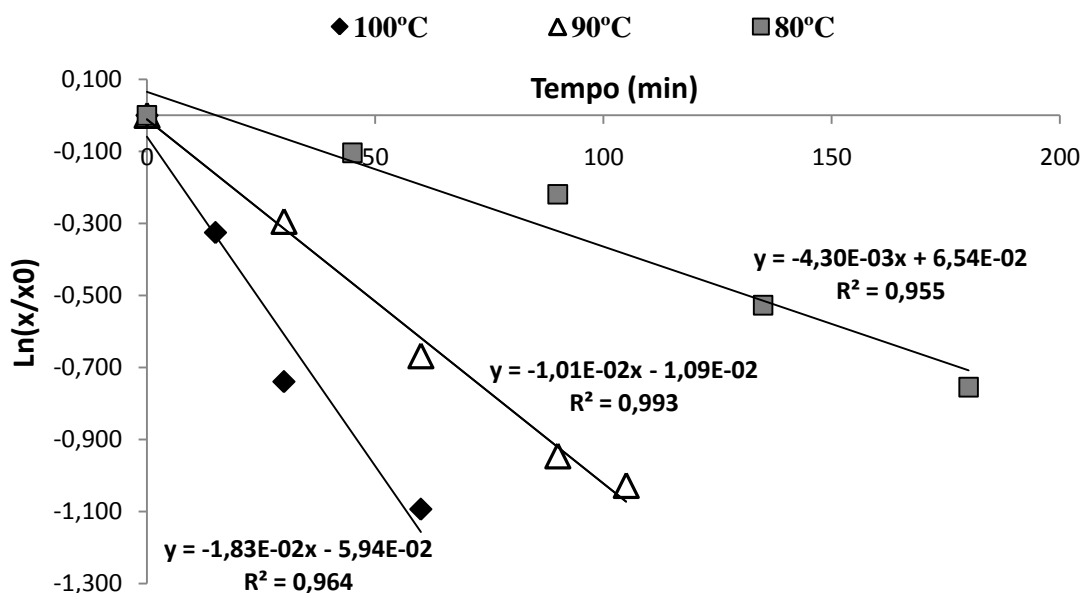


Gráfico 18 - Representação dos valores de $\ln(x/x_0)$ em função do tempo para 100 °C, 90 °C, 80 °C

Analisando o Gráfico 18, verifica-se uma linearidade para cada temperatura, sendo que a temperatura de 90 °C apresenta a melhor correlação linear ($R^2 = 0,993$) entre os referidos parâmetros. Estas linearidades comprovam que a isomerização térmica do XN segue uma cinética de 1ª ordem, sendo portanto apresentadas na Tabela 26 as constantes cinéticas calculadas pelos

Parte III. Resultados e Discussão

declives das rectas para cada temperatura (Gráfico 18) e os respectivos tempo de redução decimal e tempos de meia vida.

Tabela 26- valores das constantes cinéticas (com os respectivos intervalo de variação com 95% de confiança), tempo de redução decimal e tempo de meia vida para 100 °C, 90 °C e 80 °C

Temperatura (°C)	k (min ⁻¹)	D (min)	t _{1/2} (min)
100	$1,83 \times 10^{-2} \pm 2,52 \times 10^{-3}$	126	38
90	$1,01 \times 10^{-2} \pm 5,05 \times 10^{-4}$	228	69
80	$4,30 \times 10^{-3} \pm 5,38 \times 10^{-4}$	535	161

Analisando a Tabela 26, observa-se que quanto maior é a temperatura maior é o k, o D e o t_{1/2}, o que vem a comprovar os dados anteriormente discutidos, que quanto mais elevado é a temperatura mais rápido é o processo de isomerização do XN a IXN.

Verifica-se que para 100 °C são necessários apenas 36 minutos para se isomerizar metade da concentração inicial de XN e apenas 126 minutos para isomerizar 90%. Estes dados vem comprovar os resultados obtidos na literatura que indicam que na produção de cerveja é isomerizado grande parte do XN durante a ebulição do mosto, como já foi referida na revisão bibliográfica deste trabalho. Existe apenas um artigo na literatura em que se realizou um estudo cinético da isomerização do XN, realizado para 100°C [43], tendo sido obtido um t_{1/2} de 30 minutos, sendo muito próximo do t_{1/2} calculado neste trabalho experimental (36 minutos).

Como seria de esperar, a 80 °C a velocidade de isomerização do XN é mais lenta, sendo necessário 161 minutos para se isomerizar metade da concentração inicial de XN e 535 minutos para isomerizar 90%. Estes valores vêm indicando boas perspectivas para a utilização de temperaturas não muito elevadas combinado com AP para aumentar a extracção do XN dos *pellets* com pouca ou quase nenhuma isomerização do mesmo.

2.5 Energia de activação e sensibilidade à temperatura da isomerização do XN

Depois de se obterem as constantes cinéticas e os tempos de redução decimal para cada temperatura, calculou-se a energia de activação (E_a) e a sensibilidade à temperatura (z) da isomerização do XN.

Na tabela 27 encontra-se resumido os valores de $1/T$, $\ln(k)$ e $\log(D)$ para para 100°C, 90°C e 80°C. O Gráfico 19 apresentada valores de $\ln(k)$ em função de $1/T$ (A) e os valores de $\ln(D)$ em função da temperatura (B).

Tabela 27- Valores de $1/T$, $\ln(k)$ e $\log(D)$ para 100 °C, 90 °C e 80 °C

Temperatura (°C)	$1/T$ (K ⁻¹)	$\ln(k)$	$\log(D)$
100	$2,68 \times 10^{-3}$	-4,00	2,10
90	$2,75 \times 10^{-3}$	-4,60	2,36
80	$2,83 \times 10^{-3}$	-5,45	2,73

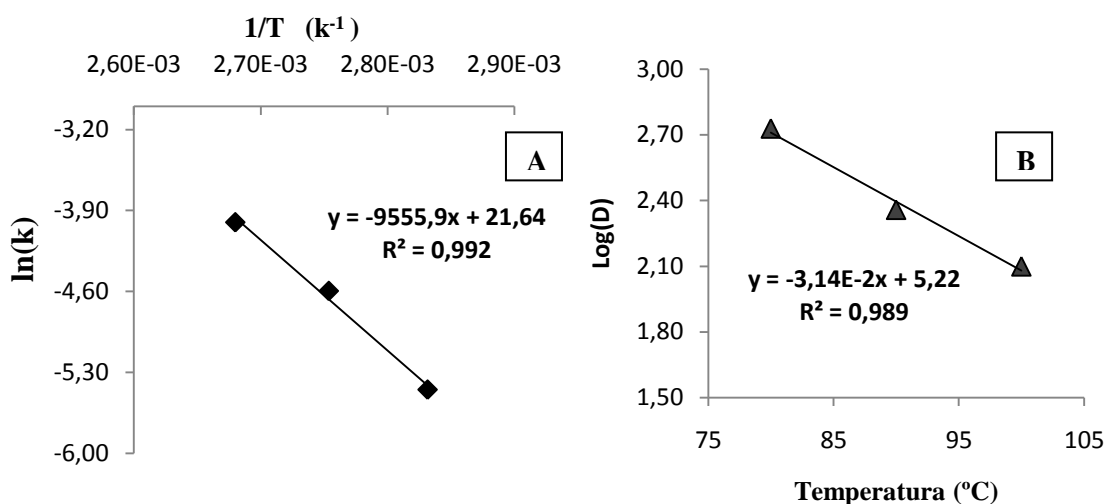


Gráfico 19- Representação dos valores de $\ln(k)$ em função de $1/T$ (A) e representação dos valores de $\log(D)$ em função da temperatura (B)

Parte III. Resultados e Discussão

Analisando o Gráfico 19, verifica-se uma boa correlação linear tanto para $\ln(k)$ em função de $1/T$ (A), $R^2 = 0,992$, como para $\log(D)$ em função da temperatura (B), $R^2 = 0,989$. Através do declive da recta da parte A e da parte B foi possível então calcular, respectivamente, o E_a e o z . Relativamente ao E_a obteve-se um valor de $7,94 \times 10^4 \text{ J.mol}^{-1}$, indicando a energia necessária para a isomerização de uma mole de XN. Enquanto que para o z obteve-se um valor de 32°C , ou seja, ao aumentar ou diminuir a temperatura de 32°C , diminui-se ou aumenta-se, respectivamente, um D.

Parte IV. Conclusão

Tendo como base o objectivo primordial deste trabalho de investigação que era aumentar o teor de xanto-humol (XN) no mosto de cerveja utilizando alta pressão (AP) após a fase de ebulição do mosto, foi primeiramente quantificado o teor de XN e isoxanto-humol (IXN) presente nos *pellets* tipo 45 (variedade *Czech Saaz*) utilizados, tendo estes apresentado um teor de XN $0,370 \pm 0,002$ %m/m e um valor de IXN abaixo do limite de detecção.

No que diz respeito ao efeito de diferentes pressões e tempos de pressurização na extracção de XN, de modo a otimizar o processo de extracção, verificou-se que as amostras de mosto pressurizadas apresentaram um teor de XN mais elevado que as amostras que não sofreram pressurização, o que demonstra que houve extracção de XN por alta pressão hidrostática. Concluiu-se que as combinações de pressões mais baixas com tempos curtos demonstram ser as mais eficientes no que se refere a aumentar o teor de XN no mosto, sendo que os melhores resultados foram obtidos nas amostras pressurizadas a 200, 250 e 300 MPa durante 5 minutos. Na amostra pressurizada a 250 MPa durante 5 minutos atingiu-se o pico máximo de concentração de XN, $0,808 \pm 0,024$ mg/L, sendo nesta amostra o teor de XN 4 vezes mais elevado que no controlo-E1 (com uma lupulagem na etapa ebulição) e 2 vezes mais elevado que no controlo-E2 (com duas lupulagens na etapa de ebulição). A concentração de IXN aumenta significativamente no mosto após ebulição, particularmente após a segunda lupulagem, respectivamente 1,694 mg/L e 4,542 mg/L. Para as amostras submetidas a pressão, apenas se verificou aumento da concentração de IXN a 100, 300 e 400 MPa, mas com valores muito menores que no controlo-E2. Estes resultados indicam que a pressão causa alguma isomerização do XN, mas muito menos que a ebulição.

Quanto ao ensaio em que se adicionou três vezes mais *pellets* ao mosto na segunda lupulagem, ensaio “*3x pellets*”, as amostras pressurizadas apresentam um teor de XN de pelo menos 5 vezes mais elevado que no controlo-E1 e praticamente o mesmo teor que no 3xp-controlo-E2. Neste ensaio o teor de XN aumentou apenas 0,188 mg/L relativamente às amostras pressurizadas no ensaio de optimização de tempo/pressão, o que pode ser devido a que neste ensaio se esteja próximo do limite máximo de solubilidade do XN no mosto “lager” utilizado. Contudo, a concentração de IXN no mosto pressurizado é muito menor que na amostra controlo com duas lupulagens (cerca de 8 vezes menor), indicando também neste caso um menor efeito da pressão na isomerização do XN.

No ensaio com mosto “preto” obteve-se um comportamento semelhante ao ensaio “*3x pellets*”, pois os valores de XN para as amostras de mosto “preto” pressurizadas não diferiram muito do respectivo controlo-E2. No entanto, é de notar que se obteve com mosto “preto” teores de

Parte IV. Conclusão

XN mais altos relativamente aos outros ensaios realizados, tendo-se conseguido obter teores de XN a volta de 1,5 mg/L para as amostras pressurizadas. A presença de um teor de XN mais elevado no mosto “preto”, pode ser devido ao aumento da solubilidade do XN em mosto torrado e de nesse mosto estarem presentes mais antioxidantes que poderão interferir com a reacção de isomerização do XN.

Relativamente às análises físico-químicas conclui-se que os tratamentos de AP utilizados neste trabalho não alteram o pH, cor e extracto primitivo do mosto, nem causam a isomerização dos ácidos alfa em ácidos iso-alfa, vindo ao encontro aos resultados obtidos na literatura.

Através da realização do estudo da cinética de isomerização térmica do XN, concluiu-se que a isomerização do XN a IXN ao longo do tempo diminui com o decréscimo da temperatura e que a isomerização térmica do XN segue uma cinética de 1ª ordem. Os tempos de meia vida obtidos variam entre 36 minutos para 100 °C e 161 minutos a 80 °C. Para o processo de isomerização térmica do XN obteve-se uma energia de activação de $7,94 \times 10^4 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$ e um valor para o factor z de 32 °C.

Com este trabalho experimental pode-se concluir que o processamento do mosto por AP mostra ser uma forma viável de extracção de XN de *pellets*, evitando ao mesmo tempo grande parte da sua isomerização, permitindo obter mosto de cerveja com uma concentração mais elevada de XN. Os valores obtidos vêm indicando boas perspectivas para a produção de cervejas enriquecidas nesse composto. Sendo o XN um composto com propriedades nutracêuticas benéficas para a saúde humana, a produção de uma cerveja enriquecida neste componente seria uma inovação de grande interesse para a indústria cervejeira.

Referências bibliográficas

1. Biendl, M. and Pinzl, C., *Hops and Health* 2008, Wolnzach: German hop museum wolnzach. 1-123.
2. Almeida, C.I.R.d., *Métodos Espectroscópicos para o Estudo da Cerveja*, Tese de Mestrado, in *department of chemistry*. 2006, Aveiro University: Aveiro.
3. Buzrul, S., Alpas, H., and Bozoglu, F., *Effects of high hydrostatic pressure on shelf life of lager beer*. *European Food Research and Technology*, 2005. **220**(5-6): 615-618.
4. Portaria1/96, Diário da República. 1.ª Série-B, N.º 2 - 3/1/1996: 8-9.
5. Goldammer, T., *The Brewer's Handbook -The Complete Book to Brewing Beer*. 2008, Virginia: Apex Publishers. 1-496.
6. Lewis, M.J. and Young, T.W., *Brewing*, ed. F. edition. 1995, London: Chapman and Hall. 1-20.
7. Cruz, J.M.M., *Produção de Cerveja*, in *Reactores Biológicos - Fundamentos e Aplicações*, M.M.d. Fonseca and J.A. Teixeira, Editors. 2007, Lidel: Lisboa. 277-305.
8. Magalhaes, P.J., Guido, L.F., Cruz, J.M., and Barros, A.A. *Analysis of xanthohumol and isoxanthohumol in different hop products by liquid chromatography-diode array detection-electrospray ionization tandem mass spectrometry*. in *29th International Symposium on Capillary Chromatography/3rd GC x GC Symposium*. 2006. Riva del Garda, ITALY: Elsevier Science Bv.
9. Magalhaes, P.J., Carvalho, D.O., Cruz, J.M., Guido, L.F., and Barros, A.A., *Fundamentals and Health Benefits of Xanthohumol, a Natural Product Derived from Hops and Beer*. *Natural Product Communications*, 2009. **4**(5): 591-610.
10. Beulens, J.W.J., de Zoete, E.C., Kok, F.J., Schaafsma, G., and Hendriks, H.F.J., *Effect of moderate alcohol consumption on adipokines and insulin sensitivity in lean and overweight men: a diet intervention study*. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2008. **62**(9): 1098-1105.
11. Kondo, K. *Beer and health: Preventive effects of beer components on lifestyle-related diseases*. in *3rd International Conference on Food Factors (ICoFF-3)*. 2003. Tokyo, JAPAN: Ios Press.

12. Wright, C.A., Bruhn, C.M., Heymann, H., and Bamforth, C.W., *Beer and wine consumers' perceptions of the nutritional value of alcoholic and nonalcoholic beverages*. Journal of Food Science, 2008. **73**(1): H8-H11.
13. Mukamal, K.J., Chung, H.J., Jenny, N.S., Kuller, L.H., Longstreth, W.T., Mittleman, M.A., Burke, G.L., Cushman, M., Psaty, B.M., and Siscovick, D.S., *Alcohol consumption and risk of coronary heart disease in older adults: The cardiovascular health study*. Journal of the American Geriatrics Society, 2006. **54**(1): 30-37.
14. Gonzalez-Munoz, M.J., Pena, A., and Meseguer, I., *Role of beer as a possible protective factor in preventing Alzheimer's disease*. Food and Chemical Toxicology, 2008. **46**(1): 49-56.
15. Hernan, M.A., Chen, H.L., Schwarzschild, M.A., and Ascherio, A., *Alcohol consumption and the incidence of Parkinson's disease*. Annals of Neurology, 2003. **54**(2): 170-175.
16. Stevens, J.F. and Page, J.E., *Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health!* Phytochemistry, 2004. **65**(10): 1317-1330.
17. Gerhauser, C., *Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents*. European Journal of Cancer, 2005. **41**(13): 1941-1954.
18. Nozawa, H., Yoshida, A., Tajima, O., Katayama, M., Sonobe, H., Wakabayashi, K., and Kondo, K., *Intake of beer inhibits azoxymethane-induced colonic carcinogenesis in male Fischer 344 rats*. International Journal of Cancer, 2004. **108**(3): 404-411.
19. Hidestrand, M., Shankar, K., Ronis, M.J.J., and Badger, T.M., *Effects of light and dark beer on hepatic cytochrome P-450 expression in male rats receiving alcoholic beverages as part of total enteral nutrition*. Alcoholism-Clinical and Experimental Research, 2005. **29**(5): 888-895.
20. Innes, G., *Cost-effectiveness of beer versus red wine for the prevention of symptomatic coronary artery disease*. Canadian Medical Association Journal, 1998. **159**(12): 1463-1466.
21. Sharp, L., Little, J., Schofield, A.C., Pavlidou, E., Cotton, S.C., Miedzybrodzka, Z., Baird, J.O.C., Haites, N.E., Heys, S.D., and Grubb, D.A., *Folate and breast cancer: the role of polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)*. Cancer Letters, 2002. **181**(1): 65-71.
22. Bell, S., Goldman, V.M., Bistran, B.R., Arnold, A.H., Ostroff, G., and Forse, R.A., *Effect of beta-glucan from oats and yeast on serum lipids*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1999. **39**(2): 189-202.

23. Hirvonen, T., Pietinen, P., Virtanen, M., Albanes, D., and Virtamo, J., *Nutrient intake and use of beverages and the risk of kidney stones among male smokers*. American Journal of Epidemiology, 1999. **150**(2): 187-194.
24. Yajima, H., Ikeshima, E., Shiraki, M., Kanaya, T., Fujiwara, D., Odai, H., Tsuboyama-Kasaoka, N., Ezaki, O., Oikawa, S., and Kondo, K., *Isohumulones, bitter acids derived from hops, activate both peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma and reduce insulin resistance*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(32): 33456-33462.
25. Nozawa, H., Nakao, W., Zhao, F., and Kondo, K., *Dietary supplement of isohumulones inhibits the formation of aberrant crypt foci with a concomitant decrease in prostaglandin E2 level in rat colon*. Molecular Nutrition & Food Research, 2005. **49**(8): 772-778.
26. Bravo, L., *Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance*. Nutrition Reviews, 1998. **56**(11): 317-333.
27. Garcia, A.A., Grande, B.C., and Gandara, J.S., *Development of a rapid method based on solid-phase extraction and liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the determination of polyphenols in alcohol-free beers*. Journal of Chromatography A, 2004. **1054**(1-2): 175-180.
28. Stevens, J.F., Taylor, A.W., and Deinzer, M.L., *Quantitative analysis of xanthohumol and related prenylflavonoids in hops and beer by liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1999. **832**(1-2): 97-107.
29. Miranda, C.L., Stevens, J.F., Helmrich, A., Henderson, M.C., Rodriguez, R.J., Yang, Y.H., Deinzer, M.L., Barnes, D.W., and Buhler, D.R., *Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (Humulus lupulus) in human cancer cell lines*. Food and Chemical Toxicology, 1999. **37**(4): 271-285.
30. Gerhauser, C., Alt, A., Heiss, E., Gamal-Eldeen, A., Klimo, K., Knauff, J., Neumann, I., Scherf, H.R., Frank, N., Bartsch, H., and Becker, H., *Cancer chemopreventive activity of Xanthohumol, a natural product derived from hop*. Molecular Cancer Therapeutics, 2002. **1**(11): 959-969.
31. Miranda, C.L., Stevens, J.F., Ivanov, V., McCall, M., Frei, B., Deinzer, M.L., and Buhler, D.R., *Antioxidant and prooxidant actions of prenylated and nonprenylated chalcones and flavanones in vitro*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. **48**(9): 3876-3884.
32. Yang, J.Y., Della-Fera, M.A., Rayalam, S., and Baile, C.A., *Effect of xanthohumol and isoxanthohumol on 3T3-L1 cell apoptosis and adipogenesis*. Apoptosis, 2007. **12**(11): 1953-1963.

33. Tabata, N., Ito, M., Tomoda, H., and Omura, S., *Xanthohumols, diacylglycerol acyltransferase inhibitors, from Humulus lupulus*. *Phytochemistry*, 1997. **46**(4): 683-687.
34. Zanolli, P. and Zavatti, M., *Pharmacognostic and pharmacological profile of Humulus lupulus L.* *Journal of Ethnopharmacology*, 2008. **116**(3): 383-396.
35. Henderson, M.C., Miranda, C.L., Stevens, J.F., Deinzer, M.L., and Buhler, D.R., *In vitro inhibition of human P450 enzymes by prenylated flavonoids from hops, Humulus lupulus*. *Xenobiotica*, 2000. **30**(3): 235-251.
36. Bhattacharya, S., Virani, S., Zavro, M., and Haas, G.J., *Inhibition of Streptococcus mutans and other oral streptococci by hop (Humulus lupulus L.) constituents*. *Economic Botany*, 2003. **57**(1): 118-125.
37. Natarajan, P., Katta, S., Andrei, I., Ambati, V.B.R., Leonida, M., and Haas, G.J., *Positive antibacterial co-action between hop (Humulus lupulus) constituents and selected antibiotics*. *Phytomedicine*, 2008. **15**(3): 194-201.
38. Mizobuchi, S. and Sato, Y., *A new flavanone with antifungal activity isolated from hops*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1984. **48**(11): 2771-2775.
39. Buckwold, V.E., Wilson, R.J.H., Nalca, A., Beer, B.B., Voss, T.G., Turpin, J.A., Buckheit, R.W., Wei, J.Y., Wenzel-Mathers, M., Walton, E.M., Smith, R.J., Pallansch, M., Ward, P., Wells, J., Chuvala, L., Sloane, S., Paulman, R., Russell, J., Hartman, T., and Ptak, R., *Antiviral activity of hop constituents against a series of DNA and RNA viruses*. *Antiviral Research*, 2004. **61**(1): 57-62.
40. Wang, Q., Ding, Z.H., Liu, J.K., and Zheng, Y.T., *Xanthohumol, a novel anti-HIV-1 agent purified from Hops Humulus lupulus*. *Antiviral Research*, 2004. **64**(3): 189-194.
41. Gerhauser, C., *Broad spectrum anti-infective potential of xanthohumol from hop (Humulus lupulus L.) in comparison with activities of other hop constituents and xanthohumol metabolites*. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2005. **49**(9): 827-831.
42. Herath, W., Ferreira, D., Khan, S.I., and Khan, I.A., *Identification and biological activity of microbial metabolites of xanthohumol*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2003. **51**(11): 1237-1240.
43. Stevens, J.F., Taylor, A.W., Clawson, J.E., and Deinzer, M.L., *Fate of xanthohumol and related prenylflavonoids from hops to beer*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999. **47**(6): 2421-2428.
44. Wunderlich, S., Zurcher, A., and Back, W., *Enrichment of xanthohumol in the brewing process*. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2005. **49**(9): 874-881.

45. Magalhães, P.J., Dostalek, P., Cruz, J.M., Guido, L.F., and Barros, A.A., *The Impact of a Xanthohumol-Enriched Hop Product on the Behavior of Xanthohumol and Isoxanthohumol in Pale and Dark Beers: A Pilot Scale Approach*. Journal of The Institute of Brewing, 2008. **114**(3): 246-256.
46. Biendl, M., Methner, F., Stettner, G., and Walker, C., *Brewing trials with a xanthohumol-enriched hop product*. Brauwelt International, 2004. **22**: 182-184.
47. Forster, A., Gahr, A., Ketterer, M., Beck, B., and Massinger, S., *Xanthohumol in beer-possibilities and limitations of enrichment*. Monatsschrift Fur Brauwissenschaft, 2002. **55**(9-10): 184-+.
48. Back, W., Zuercher, A., and Wunderlich, S., *Production of beer and other drinks with a high xanthohumol content is effected by addition to a malt or fruit wort of hops with a high xanthohumol content*, Univ Tech Muenchen (UYMU-Non-standard). 5.
49. Rahman, M.S., *Handbook of Food Preservation*. 1998, New York: Marcel Dekker. 533-569.
50. Welti-Chanes, J., Lopez-Malo, A., Palou, E., Bermudez, D., Guerrero-Beltran, J.A., and Barbosa-Canovas, G.V., *Fundamentals and applications of high pressure processing to foods*, in *Novel Food Processing Technologies*. 2005, Marcel Dekker: New York. 157-181.
51. Nunes, C.S.C., *Efeito do processamento nas características físico-químicas da Ameixa D'Elvas - Alterações ao Nível dos Polissacarídeos das Paredes Celulares, Enzimas, Aroma e Textura*, Tese de Doutoramento, in *Department of Chemistry*. 2008, Aveiro University Aveiro.
52. Yaldagard, M., Mortazavi, S.A., and Tabatabaie, F., *The principles of ultra high pressure technology and its application in food processing/preservation: A review of microbiological and quality aspects*. African Journal of Biotechnology, 2008. **7**(16): 2739-2767.
53. Knorr, D. *Effects of high-hydrostatic-pressure processes ond food safety and quality*. in *Symp on Bifido-Bacteria - Old Concepts : New Food Products, at the 1992 Annual Meeting of the Inst of Food Technologists*. 1992. New Orleans, La: Inst Food Technologists.
54. Guerrero-Beltran, J.A., Barbosa-Canovas, G., and Swanson, B.G., *High hydrostatic pressure processing of fruit and vegetable products*. Food Reviews International, 2005. **21**(4): 411-425.
55. Buckow, R., Heinz, V., and Knorr, D., *Effect of high hydrostatic pressure-temperature combinations on the activity of beta-glucanase from barley malt*. JOURNAL OF THE INSTITUTE OF BREWING, 2005. **111**(3): 282-289.

56. San Martin, M.F., Barbosa-Canovas, G.V., and Swanson, B.G., *Food processing by high hydrostatic pressure*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2002. **42**(6): 627-645.
57. Buckow, R. and Heinz, V., *High pressure processing - a database of kinetic information*. Chemie Ingenieur Technik, 2008. **80**(8): 1081-1095.
58. Hendrickx, M., Ludikhuyze, L., Van den Broeck, I., and Weemaes, C., *Effects of high pressure on enzymes related to food quality*. Trends in Food Science & Technology, 1998. **9**(5): 197-203.
59. Zhang, S., Chen, R., Wu, H., and Wang, C., *Ginsenoside extraction from Panax quinquefolium L. (American ginseng) root by using ultrahigh pressure*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006. **41**(1): 57-63.
60. Xi, J. and Zhang, S.Q., *Antioxidant activity of ethanolic extracts of propolis by high hydrostatic pressure extraction*. International Journal of Food Science and Technology, 2007. **42**(11): 1350-1356.
61. Zhang, S.Q., Xi, J., and Wang, C.Z., *High hydrostatic pressure extraction of flavonoids from propolis*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2005. **80**(1): 50-54.
62. Xi, J., *Effect of high pressure processing on the extraction of lycopene in tomato paste waste*. Chemical Engineering & Technology, 2006. **29**(6): 736-739.
63. Perez-Lamela, C., Ledward, D.A., Reed, R.J.R., and Simal-Gandara, J., *Application of high pressure treatment to the malting of barley seeds in the elaboration process of beer*. Recent research developments in agricultural & food chemistry, 2001. **5**(1): 19-24.
64. Perez-Lamela, C., Ledward, D.A., Reed, R.J.R., and Simal-Gandara, J., *Application of high-pressure treatment in the mashing of white malt in the elaboration process of beer*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2002. **82**(3): 258-262.
65. Fischer, S., Schoberl, H., Russ, W., and Meyer-Pittroff, R. *The effects of hydrostatic high pressure on the brewing process and beer*. in *International Conference on Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology*. 1998. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag Berlin.
66. Perez-Lamela, C., Reed, R.J.R., and Simal-Gandara, J., *High pressure application to wort and beer*. Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 2004. **100**(2): 53-56.
67. Buzrul, S., Alpas, H., and Bozoglu, F., *Effect of high hydrostatic pressure on quality parameters of lager beer*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2005. **85**(10): 1672-1676.

68. Jones, L. and Atkins, P., *Chemistry- Molecules, Matter and Change*. 4 ed. 2002, New York: W.H.Freeman and Company. 586-591.
69. Mateus, D. and Fonseca, M.M.d., *Transferência de Calor e Esterilização*, in *Reactores Biológicos - Fundamentos e Aplicações*, M.M.d. Fonseca and J.A. Teixeira, Editors. 2007, Lidel: Lisboa. 125-144.
70. *Analytica-EBC*, in *European Brewery Convention*. 1998, Verlag Hans Carl Getranke-Fachverlag: Nurnberg.
71. Christian, G.D., *Analytical Chemistry*. 5 ed. 1994, Washington: John Wiley & Sons, Inc. 14-54.

Anexos

1. Cromatogramas obtidos por HPLC/UV

1.1 Cromatogramas obtidos na análise de soluções padrões



Figura 12- Cromatograma referente a uma solução padrão de XN (6mg/L)



Figura 13- Cromatograma referente a uma solução padrão de IXN (2mg/L)

1.2 Cromatograma obtido na análise de extracto de *pellets*



Figura 14- Cromatograma referente a uma amostra de extracto de *Pellets 45*, variedade *Czech Saaz*

1.3 Cromatogramas obtidos na análise de amostras de mosto



Figura 15- Cromatograma referente a análise de XN de uma réplica da amostra-P 400MPa/3x5min



Figura 16- Cromatograma referente a análise de IXN de uma réplica da amostra controlo-E2

1.4 Cromatogramas obtidos na análise de amostras do estudo da isomerização térmica do XN



Figura 17- Cromatograma referente a análise de XN de uma réplica da amostra de solução modelo a 100°C retirada ao fim de 0 minutos

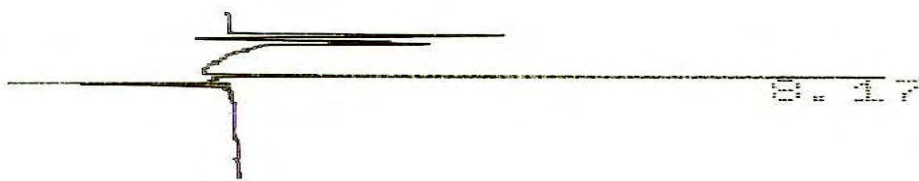


Figura 18- Cromatograma referente a análise de IXN de uma réplica da amostra de solução modelo a 100°C retirada ao fim de 30 minutos